

ПРАКТИКУМ

по биохимии растений



**ИЗДАТЕЛЬСТВО
С.-ПЕТЕРБУРГСКОГО УНИВЕРСИТЕТА**

Научная библиотека СПбГУ



1000684274

С.-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ

Под редакцией д-ра биол. наук, проф. *В. В. Полевого*
и канд. биол. наук *С. М. Щинарева*

*Рекомендовано ГК РФ по высшему образованию
в качестве учебного пособия для студентов
вузов, обучающихся по специальности "Биология"*



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
ИЗДАТЕЛЬСТВО С.-ПЕТЕРБУРГСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА
1996

52
20491
СПбУ

Рецензенты: д-р биол. наук, проф. Н. Н. Мусиенко (КГУ), д-р биол. наук, проф. Л. В. Казнович (БГУ им. В. И. Ленина)

*Печатается по постановлению
Редакционно-издательского совета
С.-Петербургского университета*



УДК 581.19.(075.8)

Практикум по биохимии растений / С. М. Шипарев, С. С. Медведев, Е. И. Шарова, О. В. Танкелюн / Под редакцией В. В. Полевого, С. М. Шипарева. — СПб.: Изд-во С.-Петербургского ун-та, 1996. 200 с.
ISBN 5-288-01454-1

В учебном пособии рассмотрены теоретические основы современных методов разделения и анализа веществ, изложен минимум знаний, необходимых студентам для работы в лаборатории. Приведены методики выделения из растений основных групп органических соединений, их качественного и количественного определения.

Пособие предназначено для студентов-биологов университетов, педагогических и сельскохозяйственных вузов.

П 1603040000 - 022
076(02) - 96 75 - 94(142 - 96)

ISBN 5-288-01454-1

© Издательство
С.-Петербургского
университета, 1996

© В. В. Полевой,
С. М. Шипарев,
С. С. Медведев и др.
1996

9649

04

Глава 1

ТЕХНИКА ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Основные правила техники лабораторных работ необходимо усвоить в начале специализации для того, чтобы избежать в дальнейшем ошибок, а значит, искаженных результатов и выводов. Объем практикума не позволяет подробно останавливаться на всех разделах техники лабораторных работ, дадим лишь самые необходимые сведения, правила и рекомендации.

1.1. ТРЕБОВАНИЯ К ПОМЕЩЕНИЮ ЛАБОРАТОРИИ

Помещение лаборатории должно быть достаточно просторным и светлым. Средняя норма площади на одного работающего в лаборатории составляет около 14 м².

В комнатах лаборатории нужны большие окна для хорошего освещения днем. Вечернее освещение (не меньше 300 лк) должно обеспечиваться потолочными лампами, а также источниками света на рабочих местах. Рабочее место следует освещать сбоку (лучше с левой стороны) или спереди от работающего. Наилучший вариант — скрытые лампы дневного света, расположенные спереди от работающего. Необходимо избегать затемнения рабочего места мебелью.

Помещения лаборатории должны быть защищены от вибрации, поскольку она нарушает работу аналитических весов и оптических приборов.

В помещениях следует обеспечивать достаточную вентиляцию. Вблизи от лаборатории не должно быть источников загрязнения воздуха (котельных, дымовых труб и др.) во избежание порчи приборов и реактивов.

1.2. ОСНОВНОЕ ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Оборудование для химико-биологических лабораторий можно подразделить на общее и специальное, зависящее от профиля работ лаборатории. Остановимся лишь на первом.

Основная экспериментальная работа в лабораториях проводится на рабочих столах. Конструкции столов бывают разные и зависят от характера работы. К ним желательны высокие

табуреты. Химические столы должны быть покрыты инертным пластиком, устойчивым к действию кислот и щелочей. К столам обычно подведены электричество и вода.

Для работы с летучими или ядовитыми соединениями, а также для сжигания органических веществ в лаборатории необходим вытяжной шкаф. Концентрированные кислоты и легковоспламеняющиеся вещества также должны храниться в специальном вытяжном шкафу.

Лаборатория должна иметь оборудование для получения дистиллированной или деминерализованной воды, помещение для мойки посуды с ванной, водонагревателем и сушильным шкафом.

В лаборатории обязательно должны быть емкости для слива ненужных, отработанных растворов и реактивов емкостью 15–20 л из полиэтилена или других антикоррозионных материалов. Эти емкости по мере наполнения вывозятся в специальные хранилища. Необходимо также мусорные бачки и корзины. Приборы, требующие стационарной установки, лучше размещать в отдельном помещении. Для аналитических весов следует оборудовать специальную весовую комнату, где весы должны быть защищены от солнечного света и вибрации.

Посуда, реактивы, приборы, лабораторное оборудование хранятся в лабораторных шкафах. Удобны настенные шкафы, а также полки для справочников и специальной литературы.

В каждой лаборатории должны быть средства пожаротушения и индивидуальной защиты — огнетушители, емкости с песком, асбестовое одеяло, резиновые сапоги и фартук, защитные очки, респираторы, резиновые перчатки, деревянный шест с крючком.

На видном месте должна находиться аптечка с необходимым набором медикаментов и препаратов, таких как мазь от ожогов, 3%-ный раствор бикарбоната натрия (против кислотных ожогов), 1%-ный раствор уксусной кислоты (от щелочных ожогов), этиловый спирт, настойка йода, жгут, пластырь, перевязочные средства, вода, мензурка для капель, нашатырь, сердечные средства.

1.3. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ

Перед началом работы в лаборатории необходимо ознакомиться с правилами техники безопасности и расписаться в кни-

ге инструктажа. Имеются общие правила работы в любой лаборатории.

При всех работах необходимо соблюдать осторожность и быть внимательным. Надо хорошо знать свойства веществ, с которыми проводятся работы, и правила пользования приборами. Рабочее место должно быть чистым, свободным, не загроможденным предметами, ненужными в работе. Надо выработать в себе привычку убирать рабочее место в конце работы и всегда содержать его в чистоте.

Пролитые жидкости или рассыпанные реактивы должны быть быстро собраны и обезврежены, а поверхность стола промыта водой и досуха вытерта.

Нельзя пользоваться в опытах грязной посудой. Курение и прием пищи в лаборатории запрещаются!

При работе в химической лаборатории надо твердо усвоить следующие правила.

Никакие вещества в лаборатории пробовать на вкус нельзя. Если необходимо понюхать газ или пары жидкости, хранящейся в банке или сосуде, не следует подносить их близко к лицу работающего, а легкими движениями направить воздух от горлышка или отверстия сосуда к носу.

При проведении какой-либо реакции нельзя держать сосуд отверстием к себе или другим работающим.

Перед проведением опыта надо хорошо уяснить его смысл и продумать ход выполнения.

Все работы, связанные с выделением вредных, пахнущих паров и газов, необходимо проводить только в вытяжных шкафах с опущенными дверцами. Предварительно следует проверить работу вытяжного шкафа.

В случае нарушения вентиляции в вытяжном шкафу все работы, связанные с выделением вредных веществ и газов, надо немедленно прекратить, а помещение проветрить.

Нельзя использовать стеклянную посуду, если имеются трещины, сколы, шербины. При обработке стекла напильником следует смочить его водой, чтобы стеклянная пыль не попала в глаза. Вставляя стеклянную трубку в резиновый шланг или пробку, смочите их предварительно водой или глицерином, а руку обмотайте полотенцем. Это предохранит вас от тяжелых травм.

Тонкостенную колбу надо закрывать пробкой, держа ее за горлышко ближе к месту, куда вставляется пробка. Большие

химические стаканы и колбы с жидкостью можно поднимать и переносить только двумя руками так, чтобы отогнутые края стакана опирались на большой и указательный пальцы. Нельзя переносить и поднимать бутылки с растворами и реактивами, держа их за горлышко. Надо обязательно поддерживать их рукой снизу.

Современный эксперимент немислим без приборов и установок. Перед работой с ними студент обязан прочно усвоить принципы действия прибора и основные правила обращения с ним. Не оставляйте приборы и установки, находящиеся под напряжением, без наблюдения. Следите за заземлением (занулением) приборов.

При использовании электронагревательных приборов следите за состоянием удлинительных шнуров и контактов. Подводящие провода должны быть хорошо изолированы. Нагревательные приборы устанавливают вдали от легковоспламеняющихся предметов, на подставке из негорючих материалов (керамика, асбест и др.).

При работе со сжиженными или твердыми газами следует пользоваться защитными очками. При работе с жидким кислородом на столе не должно быть легковоспламеняющихся материалов. Следует избегать и контакта кислорода с пористыми материалами, маслами, жирами. Жидкие азот и кислород в объемах более 0,5 л можно хранить только в металлических сосудах Дьюара.

Работа со сжатыми газами требует особого внимания и осторожности. Сжатые газы хранятся в специальных стальных баллонах определенного (для каждого газа) цвета с соответствующей маркировкой. Баллоны должны быть прикреплены к стенке или столу специальными хомутами вдали от нагревательных приборов и систем отопления. Баллоны, наполненные газом, должны быть оснащены редуктором с проверенными манометрами или коническими вентилями для понижения давления газа на выходе. Работать с неисправным редуктором запрещено. Вентиль баллона следует открывать медленно, находясь в стороне от него или редуктора. После отбора газа из баллона его вентиль надо плотно закрыть. Нельзя ударять по пустым или наполненным баллонам молотком, гаечным ключом или другими предметами во избежание взрыва.

Из баллонов нельзя выпускать весь газ. Остаточное давление в баллоне должно быть 1 - 1,5 атм.

1.4. ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ И ПРЕПАРАТЫ

Работа в биологических лабораториях всегда связана с использованием различных реактивов и препаратов.

По своему назначению они делятся на общепотребительные и специальные. К общепотребительным реактивам, запас которых имеется в каждой биохимической лаборатории, относятся кислоты (соляная, серная, азотная), щелочи (едкий натр и калий, раствор аммиака), окиси кальция и бария, ряд солей, индикаторы.

Специальные реактивы применяются сравнительно редко и только для определенных работ.

По чистоте реактивы делятся на химически чистые (х.ч.), чистые для анализа (ч.д.а.) и чистые (ч.). Для реактивов каждой из этих категорий установлено допустимое содержание примесей.

С целью экономии реактивов готовить растворы нужно только в количестве, необходимом для работы.

На всех емкостях с реактивами обязательны этикетки или надписи с указанием названия, степени чистоты, молекулярного веса и срока хранения или приготовления.

Дорогие и редкие реактивы хранят, как правило, отдельно от общих.

При взятии реактива из банки или другой тары следует избегать загрязнения их содержимого. Для этого используются чистые фарфоровые ложки или шпатели. Если реактив слежался при хранении, то верхний слой в банке разрыхляют стеклянной палочкой. Металлические шпатели или скальпели применять для этой цели не рекомендуется.

При взвешивании сухих реактивов нельзя насыпать их прямо на чашку весов.

Банки с гигроскопическими веществами должны быть герметизированы при хранении, для чего их пробки заливают парафином.

Реактивы, разлагающиеся под действием света, хранят в темных склянках, которые лучше поместить в картонную коробку. Если в таре осталось мало реактива, то его следует пересыпать в тару меньшего объема с подобранной крышечкой или пробкой.

Ряд реактивов и биопрепаратов быстро разлагается при комнатной температуре и поэтому их хранят в холодильнике или морозильной камере.

Особых условий хранения требуют огнеопасные реактивы — эфиры, спирты (метиловый, этиловый и др.), углеводороды (бензин, петролейный эфир), ароматические соединения (бензол, толуол, ксилол, ацетон). На рабочем месте должно храниться лишь небольшое, необходимое для работы, количество этих веществ. Работать с ними можно только вдали от огня и нагревательных приборов. Огнеопасные и легковоспламеняющиеся вещества хранятся в негорящей таре или шкафу, обшитом железом изнутри, в помещении с хорошей вытяжной вентиляцией.

Нельзя совместно хранить реактивы, способные при взаимодействии возгораться или выделять большое количество тепла (металлический натрий или калий с бромом и йодом). Сильные окислители (перекись водорода, бертолетову соль, перманганат калия и др.) нельзя хранить вместе с восстановителями (углем, серой, крахмалом и др.).

Ядовитые реактивы должны иметь соответствующую этикетку и храниться в запираемом шкафу.

1.5. ХИМИЧЕСКАЯ ПОСУДА И ДРУГИЕ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

По назначению посуду можно разделить на посуду общего назначения, специального назначения и мерную.

Посуда общего назначения необходима для большинства работ и всегда имеется в лаборатории. Это пробирки, воронки, простые и делительные, колбы плоскодонные, стаканы, кристаллизаторы, конические колбы (Эрленмейера), колбы Бунзена, холодильники, реторты.

Специальная посуда применяется только для какой-то определенной цели, например: аппарат Киппа, аппарат Сокслета, приборы для определения плотности, молекулярного веса и др.

К мерной посуде относят: мерные цилиндры и мензурки, пробирки, пипетки, бюретки и мерные колбы.

1.5.1. Посуда общего назначения

Пробирки бывают разной величины и диаметра и из различного стекла. Для работ, требующих нагревания до высоких температур, пробирки изготавливают из тугоплавкого стекла или кварца. Имеются также градуированные и центрифужные конические пробирки.

Пробирки используются при аналитических или микрохимических работах. Объем реагентов в пробирке не должен превышать $\frac{1}{4}$ ее объема. Сыпучие вещества вносят в пробирку с помощью шпателя или совочка из калки или бумаги шириной немного меньше диаметра пробирки, а длиной в пробирку.

Реактивы, налитые в пробирку, перемешивают, держа ее в левой руке и ударяя указательным пальцем правой руки по низу пробирки. Если пробирка заполнена жидкостью больше, чем наполовину, ее содержимое перемешивают стеклянной палочкой. Нельзя закрывать пробирку пальцем и встряхивать ее содержимое.

При сильном нагревании содержимого пробирки открытый ее конец должен быть повернут в сторону от работающего.

Если не требуется сильного нагрева, пробирку с нагреваемой жидкостью можно поместить на водяную баню со штативом для пробирок или опустить в стакан с горячей водой.

Воронки служат для переливания и фильтрации жидкостей. Воронки для фильтрации имеют угол 60° и срезанный длинный конец. При переливании жидкости через воронку в колбу, бутль или другую емкость не следует наполнять воронку до краев; периодически ее надо слегка приподнимать, чтобы выходил воздух из бутыли. Еще лучше перед переливанием вложить между воронкой и горлышком бутыли кусочек фольги, и тогда в емкости не будет создаваться высокое давление.

Плоскодоные колбы используются для приготовления и хранения растворов. Изготавливаются из обычного или термостойкого кварцевого стекла. Бывают различного объема, иногда со шлифом на горле.

Конические колбы (Эрленмейера) используются для аналитических работ, приготовления и хранения растворов. Бывают различной емкости, с носиком, узкогорлые и широкогорлые. Некоторые снабжены притертой пробкой.

Колбы Бунзена для отбрасывания применяются в тех случаях, когда фильтрование ведут с использованием вакуум-насоса. Эти колбы имеют в верхней части тубус, который через предохранительную склянку соединяют с вакуум-насосом. В горло колбы вставляется воронка с фильтром, укрепленным в резиновой пробке. Колбы Бунзена должны быть без трещин и царапин, так как они могут быть причиной взрыва колбы при разрежении давления внутри нее. Для безопасности при работе колбу Бунзена лучше обернуть полотенцем.

Кристаллизаторы — стеклянные плоскодонные сосуды различных диаметров и емкостей, высотой 5–10 см. Применяются для перекристаллизации веществ, выпаривания и в других целях. Нагревать их можно только на водяной бане.

Холодильники — приборы, применяемые для охлаждения и конденсации паров.

Холодильники, предназначенные для собирания конденсата, называются прямыми или нисходящими, а холодильники, из которых конденсат возвращается в процесс — обратными.

Прямой холодильник Либиха часто применяется в лабораторной работе. Он состоит из длинной стеклянной трубки, один конец которой расширяется. Трубка пропущена через стеклянную рубашку с двумя отводками на концах. Один из них (у узкого конца форштоса) соединяют с водопроводным краном, а другой служит для стока воды. Вода в холодильнике должна двигаться навстречу парам охлаждаемой жидкости. Холодильная рубашка должна быть целиком заполнена водой. Перегонять жидкость, используя холодильник Либиха, можно только, когда температура ее паров не превышает 150°C .

Обратные холодильники могут быть шариковыми или змеевиковыми, в зависимости от формы холодильной трубки. Таким образом, увеличивается поверхность охлаждения и достигается более полная конденсация паров.

Фарфоровая посуда более прочная, чем стеклянная, не боится сильного нагревания. Обычно используются фарфоровые стаканы различных емкостей, чашки для выпаривания разного диаметра, ступки, фарфоровые тигли, воронки Бюхнера, ложки и шпатели.

Кварцевая посуда также находит применение в лабораторной практике. Ее особенностью является термостойкость. Посуда из кварца инертна к большинству химических веществ, выдерживает температуру до 1200°C , не боится резкого охлаждения. Из кварца изготовляют различные колбы, стаканы, выпаривательные чашки, тигли и т. д.

Посуда из полиэтилена, фторопласта и других пластиков также часто используется в лабораторном обиходе. Она легкая, прочная, химически стойкая. Чаще всего используются флаконы и промывалки из полиэтилена, воронки, мензурки, центрифужные пробирки из него. В полиэтиленовую посуду можно наливать горячие растворы с температурой до 200°C .

Недостатком полиэтиленовой посуды является способность

прочно адсорбировать азотную и соляную кислоты. Отмыть от них полиэтиленовую посуду довольно трудно.

1.5.2. Посуда специального назначения

Колбы Кьельдаля имеют грушевидную форму и удлиненное горло. Емкость их обычно от 300 до 800 мл. Изготавливаются из тугоплавкого и термостойкого стекла. Используются для определения азота по Кьельдалю.

Колбы для дистилляции служат для перегонки жидкостей. Наиболее распространены колбы Вюрца. Это круглодонные колбы с длинным горлом, имеющим узкую отводную трубку, которая может быть расположена на том или ином расстоянии от шара колбы. Колбу укрепляют в штативе, соединяют с холодильником и приемником, наливают в нее через воронку (носик воронки должен быть ниже уровня отводной трубки) жидкость для перегонки на $3/4$ объема, закрывают пробкой с термометром и нагревают на бане или плите через асбест.

Эксикаторы применяются для высушивания материала и сохранения веществ, поглощающих влагу из воздуха, а также для вакуум-инfiltrации растворов в растения. Стеклянная крышка эксикатора притерта к верхнему цилиндру. Эксикаторы бывают обыкновенные и вакуумные, имеющие краник. Можно соединять эксикатор с вакуумным насосом и создавать внутри разрежение, способствующее высушиванию материала, хранящегося в нем.

Притертые части эксикатора должны быть смазаны вазелином или вакуумной смазкой. Внутри эксикатора над дном цилиндра помещают фарфоровую вкладку. В качестве поглотителей в эксикаторе используют безводный хлористый кальций, силикагель и фосфорный ангидрид — самый сильный поглотитель воды. Коническую часть эксикатора заполняют поглотителем примерно на треть высоты.

Для поглощения воды можно использовать и серную кислоту, но лишь тогда, когда ее пары не взаимодействуют с материалом в эксикаторе.

Вакуум-эксикатор при разрежении должен быть для безопасности закрыт полотенцем или специальным футляром из жести или фанеры. Впускать воздух в эксикатор под вакуум нужно понемногу, избегая сильной струи.

Крышку эксикатора легко открыть, сдвинув ее в сторону.

Хлоркальциевые трубки используются для предохранения различных веществ и растворов от попадания в них примесей из воздуха (CO_2 , паров воды и др.). Бывают прямой и U-образной формы. Для предохранения титрованных растворов щелочей от попадания CO_2 используют пробки с хлоркальциевыми трубками, наполненными натронной известью; от попадания паров воды предохраняют трубки с прокаленным хлористым кальцием или фосфорным ангидридом.

Для наполнения прямой хлоркальциевой трубки шарообразную часть ее сначала заполняют ватой, а затем насыпают поглотитель в мелких гранулах до уровня 1–2 см от верхнего края трубки. На слой поглотителя кладут слой ваты и закрывают трубку пробкой, в которую вставлена стеклянная трубочка. Поглотитель и вату не следует очень плотно набивать в хлоркальциевую трубку. Ее содержимое надо менять не реже, чем один раз в 6 месяцев.

Хлоркальциевую трубку присоединяют к сосудам или титровальным бюреткам резиновой трубкой.

1.5.3. Мерная посуда и дозаторы

Мерная посуда используется для измерения объема жидкости.

Мерные цилиндры бывают разной емкости: от 5 мл до 2 л и более. На наружной стенке цилиндры имеют деления, указывающие объем в миллилитрах. Объем жидкости в цилиндре измеряют по нижнему мениску.

Мензурки конической формы имеют деления на наружной боковой стенке. Используются для измерения объема мутных жидкостей, когда осадок концентрируется в нижней части мензурки.

Пипетки служат для точного отмеривания определенного объема жидкости. Обычные пипетки (Мора) представляют собою трубки с расширением посредине и оттянутым нижним концом.

В верхней их части имеется метка, до которой набирают жидкость. Объем таких пипеток от 1 до 100 мл. Часто используют градуированные пипетки с ценой деления 0,1 мл. Жидкость в пипетку втягивают ртом или резиновой грушей и набирают на 2–3 см выше метки, после чего медленно спускают до метки по нижнему мениску и закрывают указательным пальцем.

Дозаторы постепенно заменяют пипетки в лабораторной практике. Они позволяют набирать определенный объем растворов с большей точностью, работа с ними более производительна, и, наконец, они гигиеничны.

Выпускаются дозаторы с постоянным и переменным объемами, обеспечивающими дозирование в широком диапазоне от 2 до 5000 мкл. Дозаторы с переменным объемом имеют встроенный волюметр, обеспечивающий индикацию объемов.

К дозаторам прилагаются комплекты конусных наконечников, которые изготовлены из различных пластиков: полиэтилена, полипропилена, поливинилденфторида и др.

В некоторых дозаторах имеется встроенный выталкиватель наконечников, предохраняющий работающего от контакта с токсичными или радиоактивными растворами.

Объем жидкости, который нужно взять дозатором, устанавливается поворотом калибровочного воротка, соединенного с волюметром, в направлении уменьшения значений волюметра.

Перед работой наконечник надевается на дозатор поворотным движением по часовой стрелке. Затем следует нажать кнопку дозатора до первого упора и, держа дозатор вертикально, погрузить наконечник в жидкость на 2–3 см. Постепенно отпуская кнопку, набрать жидкость в пипетку и вынуть наконечник из жидкости примерно через 1–2 с. Сливать жидкость плавно в течение 2–3 с, нажимая кнопку дозатора до первого упора, прикасаясь наконечником к стенке сосуда. Остатки жидкости в наконечнике удалить быстрым нажатием кнопки до второго упора. Если операция отбора пробы однократна, можно сбрасывателем удалить использованный наконечник. Если дозатор не имеет сбрасывателя, то, снимая одной рукой наконечник, надо другой рукой держать дозатор близко к наконечнику.

Для правильной работы и сохранности дозатора необходимо соблюдать следующие правила:

- 1) не набирать жидкость в дозатор без наконечника;
- 2) пользоваться наконечниками только для соответствующего вида дозатора;
- 3) не допускать горизонтального положения дозатора с жидкостью при работе;
- 4) не нажимать резко кнопку дозатора при работе;
- 5) перед работой ополоснуть наконечник измеряемой жидкостью;
- 6) не допускать падения или ударов дозатора.

Правильность работы дозаторов проверяют 2–3 раза в месяц с помощью гравиметрического теста, взвешивая на аналитических весах в стеклянном стаканчике пробы дистиллированной воды, взятые дозатором. Результаты проверок удобно записывать в контрольную тетрадь, образец записи приводится ниже. Для расчета погрешности точности и повторяемости дозировок необходимо взвесить не менее 10 проб.

Запись результатов проверки дозаторов

Номер дозатора	Показания счетчика	Масса тары и воды, г	Масса воды, мг
1861	20 мкл	31,127 (тара)	—
		31,149	22
		31,174	25
		31,204	30
	
			Среднее $25 \pm \dots$

По результатам взвешивания определяют погрешность точности дозирования по формуле:

$$A\% = \frac{\bar{x} - x_0}{x_0} \cdot 100\%,$$

где $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$, \bar{x}_0 — номинальное значение; x_i — замеренное значение; n — число измерений.

Погрешность повторяемости находят по формуле:

$$P\% = \frac{1}{x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \cdot 100\%.$$

Бюретки, применяемые при титровании или для измерения точных объемов, бывают нескольких типов. В биохимических лабораториях чаще используют объемные бюретки и микробюретки.

Объемные бюретки бывают с притертым краном и бескрановые с оттянутым концом, к которому присоединяют резиновую трубку со стеклянной бусинкой внутри или металлическим зажимом, и трубку с капилляром на конце. На наружной стенке бюретки имеются деления в 0,1 мл.

В бюретки с краном можно наливать все жидкости, кроме щелочей, которые могут вызвать заедание притертого крана. Для работы со щелочами используют бескрановые бюретки. Перед заполнением бюретку следует ополоснуть рабочим раствором два-три раза.

Бюретку заполняют жидкостью через воронку с коротким концом, не достигающим до нулевой отметки бюретки. Бюретка полностью должна быть заполнена раствором от носика крана до нулевого деления. В отводной части бюретки не должно быть пузырьков воздуха. Для этого нижнюю часть бюретки опускают в стакан с рабочей жидкостью и через верхний конец медленно всасывают ее с помощью резиновой груши в бюретку. Когда в капилляре или кончике бюретки нет пузырьков воздуха, бюретку заполняют раствором немного выше нулевой отметки, вынимают из нее воронку и окончательно устанавливают уровень жидкости в бюретке на нулевой отметке. Уровень жидкости прозрачных растворов устанавливают по нижнему мениску, непрозрачных — по верхнему. Бюретка должна быть закреплена в штативе строго вертикально. При отсчете показаний глаз должен быть на уровне мениска. Отсчет показаний на бюретке делают не ранее чем через 30 с после окончания титрования.

Микробюретки, в отличие от обычных, имеют градуировку 0,01 мл, что дает возможность делать отсчеты с большей точностью.

Растворы в бюретках не хранят!

После работы бюретку следует тщательно промыть водой и оставить в штативе открытым концом вниз. Избегать попадания пыли в бюретку. Кран из бюретки нужно вынуть, обернуть фильтровальной бумагой и затем вставить назад в бюретку. Перед работой кран можно смазать тонким слоем вазелина.

Мерные колбы служат для разбавления различных растворов до определенного объема и для растворения вещества в определенном объеме растворителя. Это плоскодонные колбы различной емкости. Часто имеют пришлифованные стеклянные или полиэтиленовые пробки. Могут закрываться и резиновыми пробками, если раствор в колбе химически не взаимодействует с резиной.

На горле колбы имеется кольцевая метка, а на колбе указана ее емкость в миллилитрах при определенной температуре.

Воду или другие жидкости наливают в мерную колбу до уровня 0,5 – 1 см ниже метки, а потом по каплям до тех пор, пока

нижний мениск не достигнет ее уровня.

При подготовке растворов растворяемое вещество переносят в колбу через сухую воронку, тщательно промывая ее небольшими порциями воды. Колбу заполняют до половины водой и осторожно перемешивают содержимое до полного растворения, после чего доливают воду до метки. Плотнo закрыв колбу пробкой, перемешивают раствор многократным переворачиванием, держа колбу за горлышко и прижимая пробку указательным пальцем.

1.6. МЫТЬЕ И СУШКА ХИМИЧЕСКОЙ ПОСУДЫ

Пользуясь химической посудой, надо быть уверенным в ее чистоте. Стеклопная посуда считается чистой, когда на стенках ее не образуется отдельных капель и вода оставляет равномерную тонкую пленку.

Посуду надо мыть сразу после работы. Остатки ненужных растворов, а также растворов, содержащих соли драгоценных и редких металлов, надо собирать в специальные емкости. В раковину нельзя выливать концентрированные растворы кислот и щелочей, хромовую смесь, ядовитые вещества, пахнущие летучие жидкости. Концентрированные кислоты и щелочи необходимо разбавить и нейтрализовать.

1.6.1. Мытье посуды

Если химическая посуда не загрязнена жировыми и другими не растворяющимися в воде веществами, посуду можно мыть теплой водой, используя щетки и «ерши». На кончик «ерша» нужно надеть кусочек резиновой трубки, обмотать его лейкопластырем, чтобы предотвратить разбивание пробирок и другой посуды. Хорошо вымытую посуду два или три раза споласкивают дистиллированной водой.

Для мытья посуды можно применять различные моющие средства—мыло, 10%-ный тринатрийфосфат, стиральные порошки, хромовую смесь. Для приготовления хромовой смеси можно использовать двуххромовокислый натрий, который растворяют в воде, а затем добавляют к раствору концентрированную серную кислоту. На 100 мл воды берут 6 г двуххромовокислого натрия и 100 мл концентрированной серной кислоты.

Используют также раствор бихромата калия в концентрированной азотной кислоте: 200 г бихромата растворяют в 1 л азотной кислоты. Такой раствор хорошо очищает посуду при ком-

натной температуре и хранится дольше, чем хромовая смесь, которая быстро делается не пригодной для использования.

Некоторые затруднения может вызывать мытье пипеток хромовой смесью. Ее следует набирать в пипетку с помощью резиновой трубки, соединенной с резиновой грушей. Набрав смесь в пипетку, через одну-две минуты дают ей стечь, после чего пипетку моют как обычно. Если требуется вымыть много пипеток, то можно воспользоваться высоким толстостенным цилиндром или фарфоровым стаканом. Пипетки и бюретки должны быть погружены в него более чем наполовину. Цилиндр заливают почти доверху хромовой смесью. Через некоторое время пипетки переворачиваются другими концами.

Хромовую смесь не используют для мытья посуды, загрязненной продуктами перегонки нефти. В этих случаях для мытья применяют органические растворители. Нельзя мыть хромовой смесью и посуду, загрязненную солями бария, так как на стенках может появиться трудно удаляемый осадок.

В качестве моющего средства применяют и подкисленный 4%-ный раствор марганцевокислого калия (на 100 мл раствора добавляют 3–5 мл концентрированной серной кислоты). Состав для мытья используется однократно. Если на стенках появляется бурый налет, то его ополаскивают 3–5%-ным раствором щавелевой кислоты, а затем промывают посуду водой.

Хромовая смесь и подкисленный раствор перманганата ухудшают качество стекла. Такого эффекта не дает смесь Комаровского, состоящая из равных объемов 5%-ного раствора перекиси водорода и 6 н. соляной кислоты. Смесь нагревается до 30–40°C, ею ополаскивают стенки посуды, которые затем промывают водой. Смесь может повторно использоваться для мытья.

Некоторые аналитические работы и эксперименты требуют особо чистой посуды. Стеклопосуда может сорбировать на стенках ряд катионов, что сказывается на результатах опытов. Чтобы избежать этого, посуду после мытья дважды попеременно ополаскивают 5%-ным раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), а затем споласкивают четыре–пять раз бидистиллированной водой.

Имеется несколько способов мытья наконечников для дозаторов.

Один вариант: после работы со спирторастворимыми веществами наконечники заливают 96%-ным спиртом, энергично



встряхивают и сливают спирт. Эту операцию выполняют дважды. Затем наконечники 10 раз споласкивают водопроводной водой и 10 раз дистиллированной, после чего каждый наконечник дважды споласкивают чистым спиртом и два-три раза бидистиллированной водой.

Другой способ: в термостойкую колбу на 2 л наливают дистиллированной воды (1,5 л), добавляют две столовые ложки КОН (в гранулах), кипятят наконечники в растворе щелочи 1,5 ч, охлаждают. Процедуру выполняют еще два раза со свежим раствором КОН. После охлаждения наконечники тщательно промывают в дистиллированной воде четыре раза, а затем еще раз кипятят в дистиллированной воде.

1.6.2. Сушка посуды

В настоящее время посуду высушивают в специальных сушильных шкафах при 80–100°С. Полки шкафа покрывают перед сушкой фильтровальной бумагой, на которую раскладывают посуду. Удобно ставить посуду в шкаф на металлических подносах или в кюветах с фильтровальной бумагой на дне, причем колбы и стаканы лучше ставить горлышком вверх, что ускоряет сушку. Не следует помещать очень много посуды в шкаф, так как она может разбиться. После сушки посуда должна остыть. Лишь потом ею можно пользоваться. Не рекомендуется нагревать мерную посуду в сушильном шкафу.

Мелкую посуду можно высушить под инфракрасной лампой или феном, если ее не очень много.

Применяется и холодная сушка посуды. Так, например, до сих пор применяют сушку на кольшках, укрепленных на специальной доске. В этом случае необходимо следить за чистотой кольшков. Перед сушкой их протирают и оборачивают фильтровальной бумагой.

Быстро и надежно можно высушить посуду спиртом и серным эфиром, ополаскивая ее последовательно этими жидкостями. Такую сушку проводят только в вытяжном шкафу, этиловый спирт и серный эфир сливают после ополаскивания посуды в разные емкости. Пары эфира быстро удаляют струей холодного воздуха от фена.

Мелкую стеклянную посуду можно высушить и сохранить от загрязнения в вакуум-эксикаторе с твердым поглотителем.

Чистую посуду необходимо хранить в местах, защищенных от грязи и пыли. Обычно ее помещают в отдельные коробки

по назначению, закрывают фильтровальной бумагой и ставят в шкаф или ящики химических столов.

1.7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ДИСТИЛЛИРОВАННОЙ ВОДЫ

Пары кипящей жидкости при охлаждении могут конденсироваться и вновь превращаться в жидкость. Такой процесс называется перегонкой, или дистилляцией и часто применяются для очистки жидкостей.

Дистиллированная вода, которую получают с помощью различных типов дистилляторов, необходима для приготовления растворов и мытья посуды. Ее используют для получения бидистиллированной воды и особо чистой воды.

Газы, содержащиеся в воздухе, и летучие вещества из перегоняемой воды могут попасть в дистиллированную воду. Освободиться от них можно лишь путем многократной перегонки.

Убедиться в отсутствии примесей в дистиллированной воде можно, выпарив несколько ее капель на часовом стекле. Если вода без примесей, осадка после ее упаривания не остается. Удельное сопротивление дистиллированной воды должно быть не менее $5 \cdot 10^5 \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Важно правильно хранить дистиллированную воду. При перегонке ею наполняют стеклянные бутылки большого объема с притертой пробкой или канистры из полиэтилена. Неприятный запах последнего можно удалить вымачиванием канистр в горячем 10%-ном растворе бикарбоната натрия.

Из больших емкостей дистиллированную воду для использования наливают в бутылки (3–5 л) с тубусом около дна. Тубус закрыт резиновой пробкой с коленчатой трубкой и зажимом. Горлышко бутылки обязательно закрывают резиновой пробкой с хлоркальциевой трубкой, заполненной натронной известью. Долго хранить дистиллированную воду нельзя. Во избежание выщелачивания стекла лучше использовать старые бутылки.

Для экспериментов чаще используют бидистиллированную воду, получаемую путем вторичной перегонки дистиллированной воды, в которую добавляют перманганат калия ($\sim 0,1 \text{ г/л}$) и несколько капель серной кислоты.

Для особо точных анализов и экспериментов используют особо чистую воду, получаемую при пропускании дистиллированной воды через колонку со смесью ионитов. Особо чистая вода имеет сопротивление $1,5 - 2,4 \cdot 10^7 \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. В качестве

ионитов могут быть использованы марки катионита КУ-2 в H^+ -форме и анионита ЭДЭ-10П в OH^- -форме в объемном соотношении 1,25:1. Ионитами заполняют пластиковые колонки высотой 60–70 см и диаметром 50–70 мм. Дистиллированную воду последовательно пропускают через колонки с катионитом и анионитом. Все водопроводящие части такой установки должны быть сделаны из пластика.

Килограмм смеси ионитов может очистить 800–1000 л дистиллированной воды, после чего иониты регенерируют.

1.8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

Растворимость вещества — это его способность распределяться в среде растворителя. Растворимость определяется максимальным количеством килограммов вещества, растворившегося в 100 кг растворителя при данной температуре. Раствор в этом случае называется насыщенным.

Если же содержится меньше вещества, чем возможно в соответствии с его растворимостью при данной температуре, то такой раствор называется ненасыщенным.

1.8.1. Способы выражения концентраций рабочих (титрованных) растворов

Концентрацией раствора называется количество вещества, содержащееся в определенном количестве растворителя или раствора. Чаще всего количество растворенного вещества выражают в весовых единицах. Количество раствора может быть как в весовых, так и в объемных единицах. Применяют следующие способы выражения концентраций растворов:

Титр по рабочему веществу ($T_{р.в.}$), или *титр* (T) — количество граммов вещества, содержащихся в 1 мл раствора.

Титр по определяемому веществу ($T_{р.в./о.в.}$) — количество граммов определяемого вещества, содержащегося в 1 мл рабочего раствора. Так, например, $T_{HCl/NaOH} = 0,004035$ означает, что количество HCl , содержащееся в 1 мл раствора соляной кислоты, эквивалентно 0,004035 г едкого натра.

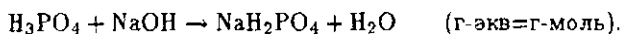
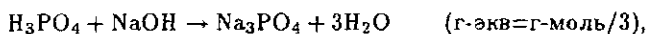
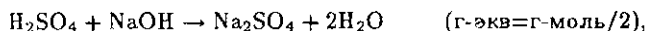
Процентная концентрация ($C\%$) показывает, сколько граммов растворенного вещества содержится в 100 г данного раствора.

Объемная концентрация ($C_{v/v}$), или *объемные проценты*, применяется только для выражения концентрации при смешивании взаиморастворяющихся жидкостей (например, спирт и вода).

Молярная концентрация (C_M), или **молярность**, — число молей растворенного вещества, содержащееся в 1 л раствора (но не растворителя), моль/л.

Моляльная концентрация C_m — число молей вещества, растворенного в 1 кг растворителя, моль/кг.

Нормальная концентрация, или **нормальность**, C_N , или N — число грамм-эквивалентов (Э) растворенного вещества, содержащееся в 1 л раствора. Грамм-эквивалент — это количество граммов вещества, химически эквивалентное 1 г-атому или 1 г-иону H^+ в данной реакции. Например:



Лецинормальный раствор обозначают 0,1 н., сантинормальный — 0,01 н. и т.д. Если навеска исходного вещества (Q) растворена в объеме V , то $C_N = N = Q \cdot 1000/\mathcal{E}$, где V — объем раствора (мл), откуда $Q_{\text{г}} = N \cdot \mathcal{E} \cdot V/1000$, $Q_{\text{мг}} = N \cdot \mathcal{E} \cdot V$. Таким образом, в отличие от грамм-молей, грамм-эквиваленты не представляют собой постоянного числа и зависят от реакции, в которой данное вещество участвует. Грамм-эквиваленты являются весовыми количествами веществ, вступающих в реакцию друг с другом. При титровании в точке эквивалентности оказываются одинаковыми число грамм-эквивалентов титруемого и рабочего вещества. Поэтому на нейтрализацию 1 г-эkv любой кислоты требуется 1 г-эkv любой щелочи.

Соотношение нормальности и титра: $N \cdot \mathcal{E} = T$ (г/мл).

Так как нормальность раствора обозначает число грамм-эквивалентов вещества в 1 л или число миллиграмм-эквивалентов в 1 мл данного раствора, то произведение объема раствора (V), выраженное в литрах, на его нормальность (N) равно числу грамм-эквивалентов вещества: $\mathcal{E} = N \cdot V$.

При определении концентрации анализируемого раствора используют основное положение объемного анализа, гласящее, что объемы растворов двух полностью прореагировавших между собой веществ обратно пропорциональны нормальностям этих растворов, т.е. в точке эквивалентности $V_1/V_2 = N_2/N_1$; следовательно, при одинаковых нормальностях растворов реакции идут между равными их объемами.

1.8.2. Расчеты концентраций при смешивании и разбавлении растворов

При разбавлении раствора водой его концентрация меняется обратно пропорционально изменению объема. При смешивании нескольких растворов различных веществ уменьшается концентрация всех смешиваемых соединений. Чтобы узнать, в каких концентрациях следует взять два раствора (с известными концентрациями) для получения раствора заданной концентрации, пользуются *правилом креста*. В центре пишут величину концентрации раствора, который необходимо приготовить. У концов линий слева пишут величины концентраций исходных растворов (большую — сверху, меньшую — снизу). У концов линий справа, вычитая из больших величин меньшие, записывают искомые количества раствора. Вычитание проводится по направлению линий. В общем виде схема решения задач выглядит следующим образом

$$\begin{array}{ccc}
 a & \diagdown & M_a \\
 & c & \\
 b & \diagup & M_b
 \end{array}
 \qquad
 \begin{array}{l}
 M_a = c - b \\
 M_b = a - c
 \end{array}$$

Примеры: в каком соотношении нужно смешать 90%-ный и 10%-ный растворы серной кислоты, чтобы получить 40%-ный раствор?

$$\begin{array}{ccc}
 90 & \diagdown & 30 \\
 & 40 & \\
 10 & \diagup & 50
 \end{array}
 \qquad
 \begin{array}{l}
 40 - 10 = 30 \\
 90 - 40 = 50
 \end{array}$$

Следовательно для получения 40%-ного раствора серной кислоты необходимо взять 30 весовых частей 90%-ного раствора и 50 частей 10%-ного раствора.

Для перехода от процентной концентрации к молярности или нормальности необходимо знать плотности растворов, которые можно найти в справочниках.

Например, необходимо узнать нормальность 20%-ного раствора серной кислоты. По справочной таблице находим плотность кислоты $d = 1,14 \text{ г/см}^3$; 100 г (P) 20%-ного раствора серной кислоты занимают объем V равный: $P/d = 100/1,14 = 87,6 \text{ мл}$. Отсюда по пропорции находим содержание серной ки-

слоты в 1000 мл 20%-ного раствора:

$$20 \text{ г} - 87,7 \text{ мл}$$

$$x \text{ г} - 1000 \text{ мл},$$

$$x = 228 \text{ г}, \quad N = Q/\varnothing = 228/49 = 4,65 \text{ н.}$$

Титрованные растворы могут быть приготовлены из фиксаторов или получены в результате растворения навески в определенном объеме растворителя. Для приготовления титрованных рабочих растворов необходимо брать вещества, соответствующие следующим требованиям: вещество должно быть химически чистым, соответствовать формуле (кристаллогидраты), устойчивым при хранении, иметь большой грамм-эквивалент (повышается точность навески).

Кроме точных растворов, можно приготовить и раствор приблизительной концентрации, а затем уточнить ее с помощью титрования раствора.

Титрование можно проводить двумя способами — *пипетированием* и *методом отдельных навесок*.

Чтобы перейти от полученной концентрации ($N_{\text{пр.}}$) к требуемой ($N_{\text{теор.}}$), вводится поправка на нормальность:

$$f = N_{\text{пр.}}/N_{\text{теор.}} = V_{\text{теор.}}/V_{\text{пр.}}$$

1.8.3. Приготовление титрованных растворов кислот

Приведем пример приготовления децинормальных кислот (соляной, серной) из концентрированных.

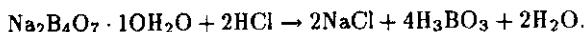
Ход работы. Ареометром определяют плотность концентрированного раствора кислоты и по справочнику находят ее процентную концентрацию. Рассчитывают объем (мл) концентрированной кислоты, необходимый для получения 250 мл 0,1 н. кислоты: нужный объем концентрированной кислоты осторожно, с помощью дозатора или пипетки с грушей переносят в мерную колбу на 250 мл, заполненную на 2/3 дистиллированной водой. Объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой.

Определение нормальности полученной кислоты проводят двумя способами:

1. Кислоту пипеткой Мора (20 мл) отбирают в конические колбы (100 мл) и оттитровывают из бюретки 0,1 н. раствором

едкого натра (индикатор — фенолфталеин). Нормальность кислоты и поправку рассчитывают, исходя из того, что в точке эквивалентности $NV_{к-ты} = NV_{щел.}$

2. Навеску буре (~ 400 мг) растворяют в горячей воде в химическом стакане и титруют полученным раствором кислоты из бюретки (индикатор — метилоранж):



Нормальность кислоты и поправку к ней рассчитывают, исходя из того, что в точке эквивалентности число грамм-эквивалентов кислоты равно числу грамм-эквивалентов буре:

$$\frac{NV}{1000} (к-ты) = \frac{Q}{\Xi} (буре)$$

1.8.4. Приготовление 0,1 н. раствора едкого натра

Для приготовления 0,1 н. раствора щелочи сначала готовят концентрированный раствор, из которого берут необходимое количество и разбавляют.

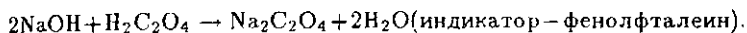
Ход работы. 25 г едкого натра растворяют в дистиллированной воде в фарфоровом стакане, с охлаждением, так как раствор сильно разогревается, доводя конечный объем до 100 мл. Затем рассчитывают, какой объем (мл) концентрированной щелочи необходимо взять, чтобы приготовить 250 мл 0,1 н. раствора. При этом необходимо учесть, что на воздухе раствор NaOH быстро взаимодействует с углекислотой: $NaOH + CO_2 \rightarrow Na_2CO_3$ и изменяет свой титр. Поэтому, например, для приготовления 1 л 0,1 н. NaOH (1 г-экв=40 г) обычно берут вместо расчетных 4 г—4,4 г NaOH. Далее рассчитывают, в каком объеме (мл) исходного концентрированного раствора содержится 1,1 г щелочи, необходимой для получения 0,1 н. раствора NaOH в колбе объемом 250 мл:

$$100 \text{ мл} - 25 \text{ г}$$

$$x \text{ мл} - 1,1 \text{ г}, \quad x = 4,4 \text{ мл.}$$

Раствор концентрированной щелочи набирают пипеткой с грушей и разбавляют кипяченой дистиллированной водой, так как вода, находящаяся в равновесии с воздухом, содержит углекислоту в концентрации $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$. Растворы щелочей должны быть закрыты пробками, в которые вставлены трубки с натронею известью ($CaO + NaOH$) для поглощения CO_2 из воздуха.

Нормальность приготовленного раствора NaOH проверяют по 0,1 н. щавелевой кислоте, приготовленной из фиксанала:



Рассчитывают поправку на нормальность приготовленного 0,1 н. раствора NaOH.

1.9. ЭКСТРАКЦИЯ, КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ, ВЫПАРИВАНИЕ, ВЫСУШИВАНИЕ

Под экстракцией понимают извлечение растворителями каких-либо веществ из смеси. В основе экстракции лежит различная растворимость веществ в каком-то одном растворителе, а также закон распределения веществ между двумя несмешивающимися жидкостями. Экстракцию можно разделить на твердо-жидкофазную и жидко-жидкофазную. При первой продукт из твердой фазы переходит в жидкую, а при второй из одной жидкой фазы в другую. В качестве растворителей используют воду и водные растворы, органические растворители и расплавы.

К твердо-жидкофазной экстракции относится экстракция водой из сухих листьев органических кислот, солей и других водорастворимых соединений. Экстракция липидов и белков из растительного материала может проводиться ацетоном.

Жидко-жидкофазная экстракция часто применяется для извлечения из культуральной жидкости витаминов, пигментов, антибиотиков и других продуктов органическими растворителями (крезол, хлороформ, бензиловый спирт и пр.).

Экстракцию веществ растворителями из твердой фазы проводят в стеклянных или фарфоровых стаканах, колбах, пробирках с обратным холодильником, специальных экстракторах (например, в аппаратах Сокслета).

Экстракцию веществ или жидкостей из раствора проводят с помощью делительной воронки. Раствор с веществом, которое необходимо извлечь, наливают в делительную воронку (1/2 объема) и добавляют к нему подходящий растворитель в объеме, вдвое меньшем объема раствора. Воронку закрывают и переворачивают ее плавно вверх и вниз 15–20 мин. Жидкости должны не перемешиваться в воронке (иначе образуется стойкая эмульсия), а как бы скользить одна по другой. По окончании экстракции делительную воронку укрепляют в штативе, ждут полного расслоения ее содержимого, открывают пробку и через кран медленно сливают нижний слой жидкости

в приемник, пока в воронке не останется лишь верхний слой. Его сливают через горло воронки. Экстрагирование проводят несколько раз. Растворитель отгоняют в перегонной колбе, где остается выделенное вещество.

Эффективность экстракции можно повысить многократной заменой экстрагента, нагреванием жидкости, содержащей продукт и экстрагент, понижением давления в аппарате для экстракции, подбором оптимальных растворителей.

Для экстракции нестойких при нагревании продуктов применяют метод холодной экстракции (криоэкстракции). При этом используют растворители, кипящие при низких температурах и находящиеся при комнатной температуре в газообразном состоянии (жидкий бутан или пропан).

При осторожном нагревании до 0°C кипящий растворитель улетучивается, а продукт остается в чистом виде.

Органические кислоты, в том числе и малорастворимые в воде, извлекаются из замороженных образцов жидким аммиаком.

Экстрагирующие агенты могут быть в газообразном состоянии, например, водяной пар.

Кристаллизация часто применяется для очистки кристаллических веществ. Суть ее состоит в том, что при охлаждении насыщенного раствора из него выпадают в осадок кристаллы растворенного вещества.

Чтобы перекристаллизовать какое-нибудь вещество, его растворяют в подходящем растворителе, нагретом до кипения, до получения насыщенного раствора. Если раствор мутный, содержит примеси, то его отфильтровывают в кристаллизатор или стакан. Для быстрого охлаждения емкости можно поместить в снег или воду со льдом. Выпавшие кристаллы отделяют от маточного раствора путем фильтрования, отжимают или сушат. Для тщательной очистки перекристаллизацию проводят несколько раз.

Высушивание называют процесс удаления воды или органических растворителей из вещества, которое может быть в газообразном, жидком или твердом состоянии. Газы и пары высушивают путем адсорбционного поглощения воды специфическими адсорбентами (связывающими воду, но не адсорбирующими высушиваемые вещества). Пропуская газ через такой адсорбент, можно удалить пары воды. Универсальными адсорбентами — поглотителями воды — являются цеолиты. Пары воды могут быть поглощены и гигроскопическими веществами — серной

кислотой, CaCl_2 . При высушивании нужно пользоваться только тем гигроскопическим веществом, которое не взаимодействует с высушиваемым. Чаще всего для высушивания применяют нагревание. Если вещество не боится нагрева, воду удаляют в сушильном шкафу при $100 - 105^\circ\text{C}$, равномерно повышая температуру. Для нестойких к нагреву веществ применяется низкотемпературная сушка в вакууме. Сильно гигроскопичные вещества высушивают в эксикаторе, содержащем какое-либо вещество, поглощающее влагу (серная кислота, фосфорный ангидрид и др.). Для высушивания многих осадков применяют инфракрасные лампы, а в некоторых случаях органические растворители, хорошо растворяющие воду (этиловый спирт, ацетон). Обезвоживающим агентом для органических жидкостей, содержащих воду, является прокаленный хлористый кальций, который насыпают в сосуд с высушиваемой жидкостью, встряхивают несколько раз и оставляют стоять сутки; затем осуществляют перегонку жидкости. Хлористым кальцием нельзя сушить спирты. Для высушивания спиртов применяют окись кальция или серноокислую медь; для растительного материала часто используют лиофильную сушку в вакууме.

Выпаривание применяется для повышения концентрации вещества, содержащегося в растворе. Скорость испарения жидкости зависит от ее природы, температуры, поверхности испарения, давления, тока воздуха над испаряемой поверхностью, от перемешивания раствора.

Для выпаривания применяют фарфоровые чашки разных диаметров или фарфоровые тигли. Раствор в чашках нагревают на водяной или песочной бане, а иногда в сушильном шкафу, кроме органических, огнеопасных жидкостей.

Наиболее быстро и эффективно упаривание происходит в ротационных пленочных испарителях, где испарение проводится под вакуумом. Прибор очень удобен для концентрирования растворов разлагающихся при нагревании веществ, так как процесс упаривания идет даже при комнатной температуре.

1.10. ФИЛЬТРОВАНИЕ

Для механического разделения жидких и твердых компонентов смеси применяется фильтрация. Жидкость с содержащимися в ней твердыми частицами пропускают через фильтры с порами различного диаметра. Если размер частиц больше, чем диаметр пор, то они задерживаются на фильтре. На филь-

трацию влияют давление, температура, величина частиц и вязкость жидкости.

Фильтры, применяемые в лабораторной практике, могут быть сыпучие и пористые. К первым относится, например, песок, ко вторым — керамические фильтры, прессованное стекло.

Чаще всего используются бумажные фильтры, различающиеся по размерам и плотности фильтровальной бумаги. Последнее различие определяется по цвету упаковки или бумажной ленты, заклеивающей упаковку. Розовый или красный цвет соответствует быstroфильтрующим фильтрам (диаметр пор ~ 10 нм); белый — фильтрам средней проницаемости (диаметр пор ~ 3 нм); синий — плотным фильтрам (диаметр пор 1–2,5 нм), применяющимся для мелкозернистых осадков. Желтый цвет обозначает обезжиренные фильтры.

Бумажные фильтры бывают обычные и беззольные. На упаковке указывается масса золы фильтра. Если после запятой стоит четыре нуля, такая бумага для фильтров считается беззольной. Фильтрация может проводиться через асбестовые фильтры и фильтры из пористого стекла (нутч-фильтры), впаиваемые в воронки. Через них можно фильтровать концентрированные кислоты и разбавленные щелочи. Нутч-фильтры обозначаются цифрами от 00 до 5 в зависимости от диаметра пор. Фильтры с нулевой маркировкой применяются для фильтрации грубых осадков и имеют диаметр пор 150–500 мк. У фильтров под номером 5 диаметр пор 4–6 мк. Они используются для препаративных работ с тонкими осадками.

При фильтрации нужно дать отстояться осадку, затем аккуратно, не взмучивая осадок, слить на фильтр отстоявшуюся жидкость по стеклянной палочке, прислоняя ее к стенке фильтра. Перед фильтрацией фильтр на воронке смачивают чистым растворителем. Уровень фильтра в воронке должен быть ниже края воронки. Уровень жидкости не должен доходить до края фильтра на 4–5 мм.

Иногда фильтрация в обычных условиях происходит очень медленно, и для его ускорения создают разрежение в приемнике. Для фильтрации под вакуумом используют воронку Бюхнера, колбу Бунзена, предохранительную склянку и вакуумный насос.

Когда жидкости или растворы имеют большую вязкость, их фильтрацию проводят при нагревании или под давлением.

В настоящее время широко применяются мембранные филь-

тры, поры которых меньше пор самых плотных бумажных фильтров. Такие фильтры изготавливаются на основе эфиров целлюлозы и стекловолокна, пропускают мелкие молекулы и ионы, но задерживают бактерии, бактериофаги, белки, ДНК. Мембранные нитроцеллюлозные фильтры связывают одноцепочечные полинуклеотиды и некоторые белки, особенно эффективно используются для отделения микроосадков, которые легко элюируются с фильтра. Диаметр пор нитроцеллюлозных фильтров от 0,01 до 8,0 мкм. Поры неправильной формы и занимают до 80% площади поверхности фильтра. Скорость потока через них невысокая, поэтому фильтрацию проводят под давлением или с вакуумом.

Фильтры из стекловолокна толще нитроцеллюлозных, имеют большую скорость потока, большую емкость до засорения, устойчивы во всех растворителях и при высокой температуре.

Мембранные фильтры используются для осветления растворов, замены сред у растущих бактерий, отделения осадков крупных молекул, количественного определения и измерения радиоактивности.

1.11. ОХЛАЖДАЮЩИЕ СМЕСИ

Проведение ряда химических реакций, а также некоторых технических операций в лабораторной практике требует пониженных температур. Для их получения в отсутствие специальных холодильных комнат или камер можно использовать охлаждающие смеси из солей, воды, снега или толченого льда.

Так, например, при растворении хлористого аммония (30 весовых частей) в воде (100 весовых частей) с исходной температурой 10–15°C раствор охлаждается до –5°C. Смесь хлористого кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 41 весовая часть) со снегом (100 весовых частей) охлаждается до –9°C; увеличение доли CaCl_2 в смеси до 143 частей снижает ее температуру до –55°C.

Для получения охлаждающих смесей со снегом можно использовать также хлориды калия и натрия.

1.12. ВЕСЫ И ВЗВЕШИВАНИЕ

Взвешиванием постоянно приходится пользоваться в лабораторной работе. В зависимости от точности, с которой проводится взвешивание, различают и группы весов. Одни предназначены для грубого взвешивания (точность до 1 г), другие для

более точного (до 1 мг). К первым относятся чашечные и циферблатные весы, ко вторым — технoхимические и технические весы. Самые точные — аналитические весы позволяют определять массу с точностью до долей миллиграмма.

Для каждого веса имеется свой разновес — набор гирь разной массы. В разновесе для чашечных весов могут быть гири от 1 кг до 1 г. В разновесах для технoхимических и аналитических весов имеются гири от 500 г до 1 г.

Одно из главных правил работы на весах — установка их в правильном положении по уровню или отвесу. Для регулировки положения используют передние винтовые подпорки весов. Необходимо исключить и вибрацию весов.

На всех весах обычно указана предельная нагрузка, превышать которую не рекомендуется. Нуль весов обязательно проверяется перед работой. Арретир весов можно поднимать только при нахождении стрелки указания на нуле. Нуль весов корректируется тарировочными винтами на коромысле или регулировочной гайкой. Весы могут быть одночашечные, например ВЛТК-500, и двухчашечными — ВЛР-200. Взвешивание на одночашечных весах проводится быстрее и проще. Весы не требуют разновеса, счетчик и оптическое устройство указывают массу объекта, помещенного на чашку после механического подбора встроенных в весы гирь.

При работе с двухчашечными весами взвешиваемый объект кладут на левую чашку, а гири — на правую. При использовании аналитического разновеса гири из него берут только пинцетом. На аналитических весах груз должен находиться в какой-либо таре (бюкс, тигель, часовое стекло, коробочка из кальки и др.). Перед взвешиванием определяют массу тары. Груз в таре помещают, как и разновесы, на середину чашек весов. Взвешивание на аналитических весах проводится при закрытых дверках весов. После взвешивания разновесы убираются в футляр, весы выключаются из сети.

Весы всегда должны быть чистыми, для чего их протирают мягкой тряпкой, а сор удаляют кисточкой.

На аналитических весах нельзя взвешивать в открытых сосудах летучие вещества, действующие на материал весов. Периодически весы подлежат проверке специалистами метрологами.

В лабораториях часто используют для взвешивания и торзионные, или пружинные весы. На них можно быстро определить массу маленьких образцов (до 1 г) различных материалов.

Лодочка для груза у этих весов заключена в витрину, как и у аналитических. Торсионные весы бывают двух типов: с неподвижной шкалой и подвижной стрелкой и с подвижной шкалой и неподвижной стрелкой.

Литература

Захаров Л. Н. Начала техники лабораторных работ. Л., 1981. 191 с.
Коростелев Н. П. Лабораторная техника химического анализа. М., 1981. 431 с.

Мусакин А. П., Рачинский Ю. Ф., Суглобова К. Д. Оборудование химических лабораторий. Л., 1978. 480 с.

Правдин П. В. Лабораторные приборы и оборудование из стекла. М., 1978. 303 с.

Рачинский Ю. Ф., Рачинская М. Ф. Техника лабораторных работ. Л., 1982. 431 с.

Фрайштат Д. М. Реактивы и препараты: хранение и перевозка. М., 1977. 423 с.

Глава 2

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ВЕЩЕСТВ

Разделение повсеместно используют в биохимической практике для выделения, очистки, идентификации, количественного определения, препаративного накопления как отдельных веществ, так и клеток и субклеточных компонентов. Оно может быть основано на различных принципах в зависимости от которых созданы разнообразные методы разделения.

2.1. ДИАЛИЗ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ

Разделение молекул по их величине в растворах осуществляют с помощью полупроницаемых мембран. Вода и небольшие молекулы проходят через мембрану, а крупные молекулы задерживаются ею.

Наиболее известным приемом является диализ, при котором водный раствор, содержащий молекулы разной величины, помещают в мешочек из целлофана и погружают в воду или в буферный раствор. Малые молекулы выходят из мешка наружу через мембрану, пока их концентрации внутри и снаружи мешка не станут одинаковыми. Меняя внешнюю среду, можно добиться концентрирования или разбавления раствора в мешке.

Для концентрирования вещества внутри мешка применяют также обратный диализ. Например, мешок с разбавленным раствором белка помещают в сухой, водорастворимый полимер, не способный проникнуть через мембрану (полиэтиленгликоль, сахароза), но оттягивающий воду из него.

Выпускаются специальные трубки для диализа, изготовленные из пленок, пропускающих вещества с молекулярной массой от 6000 до 14000. Для обессоливания и концентрирования значительных объемов растворов используют полимерные мембраны с размером пор от 2 до 100 Å⁹. Они значительно тоньше мембранных фильтров из нитроцеллюлозы или стекловолкна и поэтому закреплены на более толстом поддерживающем слое. Молекулы растворителя и проникающих веществ проходят через такие мембраны в результате диффузии, но скорость потока через них очень мала. На практике движущая сила разделения

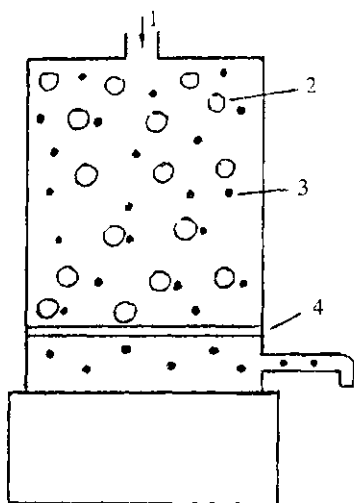


Рис. 2.1. Устройство для молекулярной фильтрации.
1 — внешнее давление, 2 — большие макромолекулы, 3 — молекулы растворителя и проникающих веществ, 4 — мембрана.

обеспечивается не градиентом концентрации, а гидростатическим давлением (рис. 2.1). При давлении 200–400 кПа, приложенном к жидкости, скорость ее потока через фильтр достаточно высокая. Такая ультрафильтрация проста, экономична и позволяет поддерживать оптимальные условия для выделяемого продукта. Она не требует изменения pH, ионной силы раствора, перевода продуктов в другую фазу и поэтому широко применяется для выделения малостабильных продуктов.

2.2 ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Центрифугирование используют для разделения многокомпонентных жидких смесей, клеточных компонентов на фракции, а также для определения молекулярной массы ряда биополимеров.

Разделение веществ центрифугированием основано на том, что скорости оседания частиц в центробежном поле зависят от их размеров, формы и плотности. Величина центробежной силы определяется скоростью вращения ротора центрифуги и ради-

усом вращения. Поскольку имеется много марок центрифуг, то для сравнения условий центрифугирования принято указывать относительное центробежное ускорение, или фактор разделения, выраженный в 981 см/с^2 . Для примерных расчетов фактора разделения обычно пользуются номограммами или таблицами, которые прилагаются к каждому ротору. Расчет времени осаждения частиц проводят по уравнению Стокса, видоизмененному Т. Сведбергом и В. Николсом:

$$t = K \frac{\eta g x_2/x_1}{N r^2 (d_p - d_m)},$$

где t — время, мин; η — вязкость жидкости, $\text{Н} \cdot \text{с/м}^2$ ($1 \text{ пуаз} = 0,1 \text{ Н} \cdot \text{с/м}^2$); x_1 и x_2 — начальный и конечный радиусы вращения, см; N — число оборотов ротора в минуту; r — радиус частицы, см; d_p и d_m — удельные плотности частицы и среды, г/см^3 ; K — константа (для частиц шарообразной формы $K=946$).

Существуют два типа центрифуг — препаративные и аналитические. Аналитические центрифуги снабжены оптической системой, позволяющей установить распределение концентраций в любой момент центрифугирования.

При использовании препаративных центрифуг требуется фракционирование центрифужных ячеек и измерение концентраций в каждой фракции.

2.2.1. Препаративное центрифугирование

Препаративное центрифугирование бывает низкоскоростное (до $20\,000 \text{ г}$) и высокоскоростное (свыше $20\,000 \text{ г}$). Низкоскоростное можно разделить на простое и дифференциальное. При простом центрифугировании добиваются полного осаждения всех частиц, находящихся в растворе. Дифференциальное центрифугирование позволяет постепенно отделять все более мелкие частицы при увеличивающихся скоростях. Его широко применяют для разделения клеточных органелл.

Высокоскоростное центрифугирование подразделяют на простое, дифференциальное и центрифугирование в градиенте плотности, который может быть непрерывным и ступенчатым. Ступенчатые градиенты могут быть простые (два-три слоя различной плотности) и сложные (более трех слоев). Центрифугирование в градиенте плотности осуществляется разными способами. Различают зональное, изопикническое и равновесное центрифугирование в градиенте плотности.

Зональное центрифугирование используют для разделения частиц по размеру. При этом в непрерывном градиенте получается ряд дискретных полос исследуемых фракций.

Изопикническое центрифугирование применяют для разделения частиц с разной плавучей плотностью, которая зависит от соотношения формы, размеров и удельной плотности разделяемых веществ, и от плотности жидкого компонента. Выделяемые компоненты не будут осаждаться, если центробежная сила уравновешена силой диффузии. Такое состояние называется изопикнической точкой. Изопикническое центрифугирование может проводиться в градиенте и без него. Используя градиент, можно добиться положения, в котором каждый компонент окажется в результате центрифугирования в своей изопикнической точке. Метод широко применяется для разделения мембранных фракций из клеток.

При *равновесном центрифугировании* в градиенте плотности образец смешивают с концентрированным раствором соли тяжелого металла и центрифугируют. Образуется градиент плотности соли, и образец оказывается в изопикнической точке.

2.2.2. Аналитическое центрифугирование

Аналитическое центрифугирование применяют для определения молекулярной массы, плотности и формы макромолекул.

В аналитических центрифугах имеются различные оптические системы, дающие изображение (седиментограмму), используемое для расчета концентрации молекул на отдельных уровнях ячейки. Это дает возможность определить молекулярную массу по формуле при помощи уравнения:

$$M = \frac{420RT \lg(C_2/C_1)}{N^2(1 - vd)(x_2^2 - x_1^2)},$$

где M — молекулярная масса, R — универсальная газовая постоянная ($8,314 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{гр.}^{-1}$), T — абсолютная температура ($^{\circ}\text{K}$), v — удельный парциальный объем (для большинства белков $0,74 \text{ см}^3/\text{г}$), C_2 и C_1 — концентрации вещества на расстоянии от центра вращения x_2 и x_1 (см) соответственно, d — плотность жидкости ($\text{г}/\text{см}^3$), N — число оборотов ротора в минуту.

2.3. ХРОМАТОГРАФИЯ

Хроматография широко применяется для качественного и количественного анализа сложных смесей, идентификации ве-

ществ и проверки их чистоты и однородности, очистки веществ от примесей, концентрирования веществ из смесей и разбавленных растворов.

Таблица 2.1. Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз

Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Название метода
Твердая	Жидкая	Адсорбционная хроматография жидкостей и растворов; ионообменная хроматография; осадочная хроматография; афинная хроматография
Твердая	Газообразная	Газовая адсорбционная хроматография
Жидкая	Жидкая	Жидкостная распределительная хроматография
Жидкая	Газообразная	Газо-жидкостная распределительная хроматография

Принцип хроматографии состоит в том, что смесь веществ помещается в систему из двух несмешивающихся фаз (подвижную и неподвижную), где разделение молекул происходит в зависимости от их способности адсорбироваться на неподвижной фазе (адсорбционная хроматография) или в зависимости от разницы в коэффициентах распределения молекул между подвижной и неподвижной фазами (распределительная хроматография), которые могут быть различны по агрегатному состоянию (табл. 2.1.).

Хроматографические методы, применяемые в биохимической практике, весьма разнообразны. Кратко рассмотрим важнейшие из них.

2.3.1. Адсорбционная хроматография

Адсорбционная хроматография основана на различной сорбции (связывании) растворенных веществ на поверхности твердой неподвижной фазы. Скорость движения молекул веществ в подвижной фазе находится в обратной зависимости от прочности связывания с неподвижной фазой. К адсорбционной хроматографии относят хроматографию жидкостей и растворов на колонках с адсорбентами, ионообменную, тонкослойную, аффинную, газовую хроматографии.

2.3.1.1. ЖИДКОСТНАЯ АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Жидкостная адсорбционная хроматография на колонках является самым старым хроматографическим методом и основа-

на на разной степени адсорбции веществ, находящихся в смеси. При пропускании растворенной смеси веществ через колонку, заполненную адсорбентом, в ней образуются в нисходящем порядке полосы, положение которых определяется адсорбционной способностью компонентов смеси. Чем прочнее связывание с адсорбентом, тем медленнее движется вещество.

Колонки для жидкостной хроматографии изготавливаются из стекла или других материалов и могут различаться по диаметру и длине. На дне колонки имеется прокладка, над которой расположен пористый сорбент-носитель. В качестве сорбента используют окись алюминия, силикагель, активированный уголь, кальций-фосфатный гель, гидроксипатит и др. Скорость подачи раствора в колонку и стока из нее регулируется.

Для хорошего разделения необходимо соблюдать ряд требований.

Колонка должна быть перед заполнением сорбентом чистой и абсолютно сухой.

Необходимо добиться однородности частиц сорбента. Предварительно они должны быть разделены на фракции определенных размеров. Колонку заполняют сухим сорбентом, либо суспензией. Иногда сорбент должен набухать в растворителе несколько часов. При заполнении колонки следует избегать пузырьков, раковин, незаполненных пространств. Особенно рядом со стенкой колонки.

На колонку, заполненную сорбентом и растворителем, наносится небольшой слой образца, после чего через нее пропускают растворитель. Если колонку заполнили очень мелкими частицами, то они оказывают растворителю значительное сопротивление, поэтому хроматографирование проводят под давлением.

Элюировать разделившиеся компоненты с колонки можно либо одним растворителем, постоянно пропуская его через колонку, либо попеременно несколькими растворителями, что позволяет получить определенные компоненты в малом объеме элюата. Часто применяют и градиентное элюирование.

2.3.1.2. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В качестве неподвижной фазы в ионообменной хроматографии используют ионообменные смолы (иониты) — высокомолекулярные вещества, несущие отрицательный или положительный заряд либо содержащие различные функциональные груп-

пы. Ионообменники практически нерастворимы в воде и обычных растворителях, механически прочные и устойчивые к воздействию некрепких кислот и щелочей.

Принцип ионообменной хроматографии состоит в том, что заряженные молекулы обратимо адсорбируются ионообменником, причем молекулы могут связываться и адсорбироваться в зависимости от ионного состава среды.

Если группы ионообменников заряжены отрицательно, они будут обменивать положительные ионы. Такие иониты называются катионитами. Если заряд группы положительный, то ионит будет обменивать анионы. В этом случае их называют анионитами. Существуют и амфотерные иониты, способные обменивать как катионы, так и анионы — амфолиты.

Ионообменный процесс можно изобразить следующими реакциями.

Катионный обмен: $\text{RAn}^- \text{H}^+ + \text{Na}^+ + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{RAn}^- \text{Na}^+ + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$.

Анионный обмен: $\text{RKt}^+ \text{OH}^- + \text{Na}^+ + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{RKt}^+ \text{Cl}^- + \text{Na}^+ + \text{OH}^-$.

R — полимерный радикал, а An^- и Kt^+ его ионогенные группы или фиксированный ион.

Разделение на ионообменниках проводят в две стадии. На первой заряженные соединения стабильно связываются с ионообменником при пропускании раствора через колонку. Сродство к ионообменнику какого-то вещества зависит от его собственных электрических свойств и относительного сродства других заряженных веществ в растворителе.

На второй стадии связанное(ые) вещество(а) можно элюировать раствором с другой ионной силой или pH. При этом происходит конкуренция ионов за связывающий центр ионита, в результате которой вещество, связанное на первом этапе, вытесняется. Условия элюирования разные для каждого вида связанных молекул.

На ионообменниках можно хроматографировать любое заряженное вещество. Чаще их применяют для разделения небольших органических молекул и ионов металлов. Белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты разделяют с помощью ионообменников на основе целлюлозы, декстрана, полиакриламида.

2.3.1.3. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Тонкослойная хроматография основана на разделении смеси веществ при передвижении ее в токе растворителя (подвижная

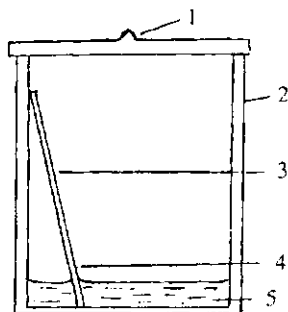


Рис. 2.2. Камера для тонкослойной хроматографии.
1 — крышка, 2 — стеклянная камера, 3 — пластинка с сорбентом, 4 — место нанесения пробы, 5 — растворитель.

фаза) через тонкий (0,25–0,5 мм) слой вещества сорбента (неподвижная фаза), равномерно нанесенного на твердую основу. Для последней используются пластинки из стекла, пластика, фольги и др. Механизм разделения в тонком слое может быть как адсорбционным, так и распределительным, когда молекулы сорбента покрыты тонким слоем жидкости, прочно связанной с ним.

Преимущества тонкослойной хроматографии определяются большой разрешающей способностью метода, высокой скоростью разделения, большой чувствительностью, позволяющей разделить малое количество сложных смесей, возможностью разделения неполярных веществ, широким ассортиментом сорбентов, устойчивостью слоя к агрессивным проявителям и нагрыванию, простотой выделения веществ с хроматограмм.

Методика тонкослойной хроматографии сравнительно проста. Пластинку с тонким слоем сорбента и нанесенным образцом помещают в камеру (рис. 2.2) с растворителем. Как только фронт растворителя дойдет до верхнего края пластины, ее вынимают из камеры и сушат. Иногда используют двумерную хроматографию.

Идентификация пятен в тонкослойной хроматографии проводится по величине R_f (отношение расстояния, пройденного пятном, к расстоянию, пройденному растворителем), окраске, флуоресценции или после обработки различными реагентами, дающими цветную реакцию с веществом пятен. Вещества можно

элюировать с сорбента соответствующими растворителями. В качестве сорбентов используются силикагель, окись алюминия, кизельгур, целит, гипс, целлюлоза, гидроокись кальция, полиамиды, сефадексы и др.

При выборе растворителя пользуются известными элюотропными рядами (табл. 2.2.), составленными на основании элюирующей способности растворителя.

Таблица 2.2. Элюотропный ряд по Штально

№ п/п	Растворитель	№ п/п	Растворитель
1	Гексан	7	Эфир
2	Гептан	8	Этилацетат
3	Циклогексан	9	Пиридин
4	Четыреххлористый углерод	10	Ацетон
5	Бензол	11	Этанол
6	Хлороформ	12	Метанол
		13	Вода

Обычно применяются системы из нескольких растворителей. Растворитель удобно выбирать микроциркулярным способом. Для этого на пластинку со слоем сорбента наносят несколько проб вещества на расстоянии 2–3 см друг от друга и через 4–5 мин в каждую точку капилляром прибавляют разные исследуемые растворители. После просушки и проявления отдельные компоненты смеси обнаруживаются в виде циркулярного кольца. Выбирают тот растворитель, который вызвал наилучшее разделение.

2.3.1.4. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Это вид адсорбционной хроматографии, при которой используется специфическое сродство выделяемого вещества и связывающейся с ним определенным образом молекулы (лиганда). Неподвижной фазой является нерастворимая матрица, к которой ковалентной связью "пришиты" молекулы лиганда.

Важным условием присоединения лиганда к матрице является сохранение его связывающих свойств. Лиганды должны обеспечивать специфичное и обратимое связывание выделяемой субстанции при концентрации ее в растворе $10^{-4} - 10^{-8}$ М.

Процесс аффинной хроматографии схематично можно изобразить следующим образом (рис. 2.3).

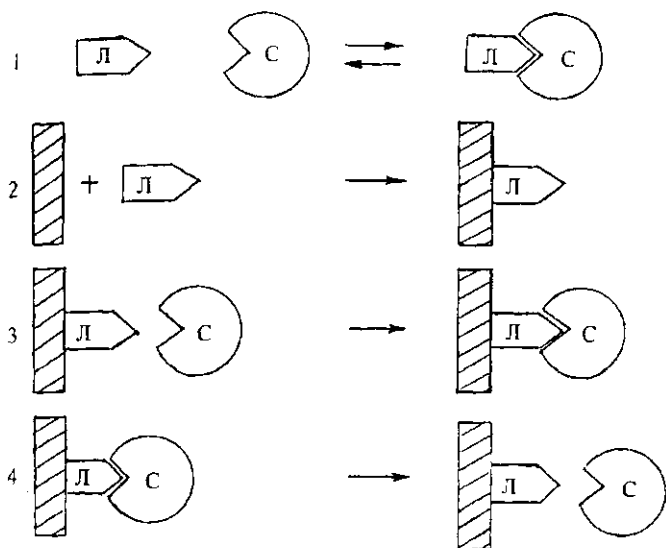


Рис. 2.3. Выделение вещества с помощью аффинной хроматографии.

1 — специфичное связывание лиганда (Л) с выделяемым веществом, 2 — иммобилизация лиганда на матрице, 3 — связывание выделяемого вещества (С) при пропускании смеси через аффинную колонку, 4 — десорбция вещества при элюировании с колонки.

В аффинной хроматографии можно использовать для разделения специфическое сродство следующих пар:

- | | | |
|---------------------|---|--|
| энзимы | ← | субстратные аналоги, ингибиторы, кофакторы |
| антитела | ← | антигены, вирусы, клетки; |
| лектины | ← | полисахариды, гликопротеины, клетки и рецепторы на поверхности; |
| гормоны | ← | рецепторы, переносчики белков, лектины, специфические белки на поверхности клеток; |
| витамины | ← | клетки; |
| нуклеиновые кислоты | ← | комплементарные базы последовательно-сти нуклеотидов, гистоны, связывающие белки; |
| конканавалин А | ← | полисахариды, гликопротеины. |

Матрицы для аффинной хроматографии изготавливают чаще всего на основе сефарозы. Они стабильны при различных условиях работы, т.е. при различных значениях pH, детергентах, повышенных температурах, органических растворителях.

Аффинная хроматография применяется для выделения и очистки определенной субстанции из сложной смеси биомолекул и позволяет выделить небольшое количество материала из большого объема смеси. С помощью аффинной хроматографии можно отделить нативные формы биомолекул от денатурированных.

2.3.1.5. ГАЗОВАЯ АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Термином газовая хроматография обозначают процесс разделения компонентов смеси, находящихся в парообразном или газообразном состоянии, подвижной фазой является газ-носитель.

Основные требования к газу-носителю состоят в более низкой адсорбируемости и химической инертности по отношению к разделяемым компонентам смеси. В качестве газа-носителя применяют азот, водород, гелий, аргон и другие газы. В качестве адсорбентов используют активированный уголь, силикагель, алюмогель, тефлон, пористое стекло, цеолиты и др.

Газовая хроматография позволяет разделить сложные смеси летучих низкокипящих углеводородов, спиртов, жирных кислот, эфиров, а также осуществлять анализ газовых смесей.

Основное ее преимущество перед жидкостной адсорбционной хроматографией заключается в скорости разделения смеси.

Газовые хроматографы состоят из следующих основных узлов:

- 1) источник газа-носителя с системой очистки и подачи в колонку,
- 2) дозатор для введения пробы в колонку,
- 3) хроматографическая колонка,
- 4) детектор с регистратором.

Хроматографическая колонка представляет собой металлическую или стеклянную трубку, заполненную гранулированным адсорбентом. Жидкие, твердые или газообразные анализируемые вещества вводят в разделительную колонку через дозатор шприцем или микропипеткой. Через термостатируемую колонку пропускается газ-носитель. В зависимости от сродства к неподвижной фазе компоненты смеси удерживаются ею в разной

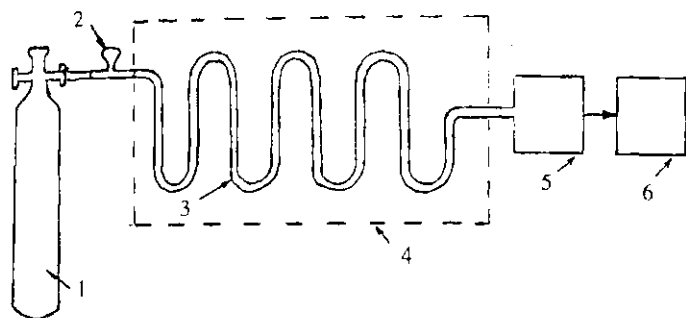


Рис. 2.4. Схема аппарата газовой хроматографии.

1 — газ-носитель, 2 — дозатор (инжектор), 3 — колонка, 4 — термостат, 5 — детектор, 6 — самописец.

степени, благодаря чему и разделяются. Разделенные компоненты выходят из колонки с потоком газа-носителя и фиксируются детектором (рис. 2.4).

Методы определения фракций в детекторе основаны на различной способности газов или паров проводить тепло или на измерении их электропроводности после ионизации в детекторе. График зависимости показаний детектора от времени называют выходной кривой, или хроматограммой. Она записывается на ленте самописца. Ее пики соответствуют сигналу детектора во время выхода из колонки определяемых компонентов. Основой качественного анализа при определенных экспериментальных условиях служит время удержания t_R , которое отсчитывается от момента впуска пробы до появления максимума пика. Площадь пика, а иногда и высота служат основными количественными характеристиками компонентов смеси. Для количественного определения необходимо построить калибровочный график: прохроматографировав различные количества веществ, установить зависимость между площадью пика и количеством вещества.

2.3.2. Распределительная хроматография

Распределительная хроматография основана на следующем принципе: если две несмешивающиеся фазы находятся в кон-

такте друг с другом и с растворенным веществом, то последнее будет распределяться между ними определенным образом, что количественно описывается коэффициентом распределения α , представляющим собой отношение концентрации вещества в водной фазе ($C_{в/ср}$) к концентрации вещества в неводной фазе ($C_{н/ср}$):

$$\alpha = \frac{C_{в/ср}}{C_{н/ср}}.$$

Вследствие различия в коэффициентах распределения вещества будут быстрее или медленнее двигаться с подвижной фазой растворителя. К распределительной хроматографии относятся хроматография на бумаге, тонкослойная, гель-проникающая, газожидкостная хроматографии.

Разделение хроматографии на адсорбционную и распределительную не очень строго, поскольку явления адсорбции есть и в распределительной хроматографии, хотя и в небольшой степени.

2.3.2.1. ГАЗОЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Это чрезвычайно эффективный вид распределительной хроматографии, при которой подвижной фазой является газ-носитель, а неподвижной — жидкость.

Преимущество газожидкостной хроматографии перед газоадсорбционной состоит в лучшем разделении компонентов, в результате получают более узкие пики на хроматограммах. С помощью газожидкостной хроматографии можно анализировать почти все вещества, обладающие хотя бы незначительной летучестью, подобрав соответствующую жидкую фазу и условия разделения. Чувствительность этого метода позволяет определить до 10^{-12} г вещества в пробе очень маленького объема.

Устройство газожидкостного хроматографа принципиально не отличается от газоадсорбционного.

Жидкой фазой хроматографической колонки является слой труднолетучего растворителя (неподвижная фаза), который должен иметь малую вязкость, нелетучесть при температуре колонки, химическую термостойкость, достаточную способность растворять разделяемые вещества. Этим требованиям удовле-

творяют вазелиновое и силиконовое масло, триэтиленгликоль и др.

В газожидкостной хроматографии используют два типа колонок — капиллярные и насадочные. В капиллярных колонках растворитель наносится на внутреннюю поверхность колонки. Насадочные колонки заполнены сорбентом-носителем с тонким слоем растворителя на поверхности. Носитель должен быть однородно пористым, адсорбционно и каталитически инертным к разделяемым веществам и хорошо удерживать растворитель. В качестве носителей применяют порошок тефлона, диатомовую землю, сферохромы, полихромы, целит-545, хромосорб и др.

Заполненные колонки нагреваются до температуры, достаточной для испарения исследуемой пробы. Эта температура должна оставаться неизменной при разделении смеси на колонке.

Анализ фракций такой же, как в газоадсорбционной хроматографии.

2.3.2.2. ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Этот вид хроматографии можно отнести к распределительной, где разделение смеси молекул, имеющих различные размеры, происходит между растворителем (подвижная фаза) и гелем (неподвижная фаза), заполняющим колонку. Гель состоит из мелких частиц инертного материала, имеющих поры. Если раствор, содержащий молекулы разной величины пропускать через такой материал, то молекулы, величина которых превышает размеры пор геля, не проникают в него и свободно движутся между частицами геля вместе с растворителем. Более мелкие молекулы проникают в частицы геля в разной степени, что зависит от их размера и формы (рис. 2.5).

Молекулы элюируются с колонки геля буфером в порядке уменьшения их размеров и молекулярного веса, поскольку крупные молекулы перемещаются с большей скоростью, чем мелкие, движение которых постоянно тормозится диффузией в гель.

В гelfильтрации используют гели с определенным размером пор, обладающие механической прочностью, не имеющие заряда и химически инертные к анализируемым веществам. Обычно применяют гели на основе декстрана (сефадексы), агарозы (сефарозы), полиакриламида. Эти гели набухают в воде и некоторых органических растворителях, но не в чистых спир-

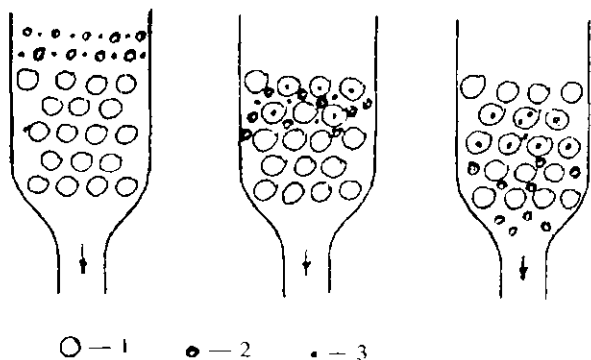


Рис. 2.5. Разделение молекул при прохождении через колонку с гелем.

1 — частица геля; 2 — молекулы, меньшие, чем поры геля; 3 — молекулы большие, чем поры геля. Стрелками указано направление движения смеси через колонку.

тах, углеводов и большинстве полярных и неполярных растворителей. Для гельфильтрации в полярных растворителях применяют стиргель, биоделс, а в неполярных — метиллированный сефадекс.

Мягкие условия разделения позволяют применять гельфильтрацию для очистки и разделения белков, ферментов, гормонов, нуклеиновых кислот и других соединений. Этим методом можно определять и молекулярные массы веществ. Пределы молекулярных масс, в которых происходит фракционирование, зависят от размера пор.

Гель-проникающая хроматография используется и для концентрирования макромолекул в солевых растворах. Для этого в раствор добавляют сухие гранулы с размерами пор меньше, чем размер молекул.

2.3.2.3. ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ

При этом виде хроматографии распределение веществ происходит между водой, связанной целлюлозой (неподвижная водная фаза) и растворителем, передвигающимся по бумаге (по-

движная органическая фаза).

Сорта бумаги для хроматографии различаются по плотности и толщине, от которых зависят скорость разделения и возможность разделить большее или меньшее количество веществ.

Техника и оборудование чрезвычайно просты. На широкой или узкой полоске, квадрате или круге из хроматографической бумаги простым карандашом отмечают место старта, куда наносят небольшое количество раствора смеси и высушивают ее. Затем хроматограмму помещают в герметичную камеру с растворителем. Капиллярные силы обуславливают движение растворителя по бумаге, которое может быть как восходящим, так и нисходящим, в зависимости от расположения бумаги и растворителя в камере. Вещества из смеси перемещаются в направлении движения растворителя. Как только фронт растворителя подойдет к краю хроматограммы, ее вынимают из камеры и тщательно высушивают от паров растворителя. На хроматограмме отмечают фронт растворителя и отдельные пятна веществ, которые видны сразу или проявляются после обработки соответствующими реактивами. Для идентификации отдельных веществ на хроматограмме сравнивают их R_f с R_f пятен стандартных свидетелей, которые также наносятся на хроматограмму перед разделением. Чем ниже коэффициент распределения у вещества, тем больше будет величина R_f , и наоборот. Величина R_f зависит от состава растворителя, бумаги, условий разделения, и по ней нельзя окончательно судить об идентификации соединения. Для этого дополнительно используют специфические цветные реакции, различные системы растворителей, флуоресценцию пятен в ультрафиолете.

Если вещества не разделяются в одном растворителе, часто применяется двумерная хроматография на бумаге. Суть метода в том, что после хроматографирования в одном направлении бумагу высушивают и пропускают другой растворитель в направлении, перпендикулярном направлению движения первого растворителя. Применяется в основном для разделения низкомолекулярных органических соединений.

2.4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля называют электрофорезом. Многие биополимеры имеют заряженные группы и поэтому способны перемещаться в электрическом поле. Движение частиц при электро-

форезе зависит от молекулярного веса, размера, формы, концентрации, электрического заряда, степени диссоциации и гидратации самих частиц, от вязкости, рН, температуры и ионной силы среды, от напряженности электрического поля и некоторых других характеристик. Подвижность частицы определяется как отношение скорости ее движения к напряженности поля. Различия в электрофоретической подвижности позволяют пространственно разделять компоненты смеси.

Существуют несколько типов электрофореза.

2.4.1. Зональный электрофорез

В зональном электрофорезе исследуемый образец наносится в виде пятна или тонкого слоя раствора на определенный носитель и помещается в электрическое поле. Молекулы, содержащиеся в растворе, перемещаются по носителю или через него. В качестве носителя используют бумагу, производные целлюлозы, различные гели. Бумага используется для низковольтного электрофореза некоторых белков и высоковольтного электрофоретического разделения аминокислот и пептидов. При этом нежелателен разогрев носителя, поэтому необходима система его охлаждения.

Часто применяется электрофорез на пластинках с использованием ацетата целлюлозы и гелей. При использовании ацетата целлюлозы удастся получить лучшее разделение, чем на бумаге, поскольку не происходит адсорбции веществ на гидроксильных группах целлюлозы. В этом случае можно использовать более низкое напряжение.

Разделяемые вещества легко адсорбируются с носителя. Его прозрачность дает возможность применять спектрофотометрические методы для определения разделяемых компонентов.

Электрофорез в гелях позволяет получить наилучшее разделение белков, нуклеиновых кислот и ряда других соединений. В практике широко используются гели из полиакриламида, агарозы и агарозы — акриламида. Полиакриламид (ПАГ) является лучшим носителем при электрофоретическом разделении белков. ПАГ получают путем полимеризации акриламида $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ и сшивающего агента N, N'-метиленабисакриламида. Гель ПАГ имеет структуру трехмерной сетки, диаметр пор которой зависит от концентрации геля. Электрофорез в ПАГ проводят в колонках с гелем и на пластинках. На одной

пластинке можно анализировать несколько образцов, поэтому их используют чаще, чем колонки.

Широко применяют гель-электрофорез в ПАГ с добавкой детергента додецилсульфата натрия и меркаптоэтанола. Образованные этими агентами белки имеют одинаковое отношение заряд/масса, и их подвижность в геле зависит только от молекулярной массы. Таким образом, можно определить молекулярную массу неизвестного белка после электрофореза вместе с двумя белками известной молекулярной массы.

Белки окрашиваются на фореграммах некоторыми красителями (амидочерный, бромфеноловый синий и др.), которые специфично связываются с белками пропорционально их количеству, но не связываются с носителем или легко вымываются из него. Количественное определение белков проводят непосредственно фотометрией электрофореграммы или колориметрией элюированной с белка краски.

Для разделения нуклеиновых кислот используют гели из ПАГ, ПАГ-агарозы или агарозы. Отношения заряд/масса у различных полинуклеотидов очень близкие. Поэтому главным разделяющим фактором в геле является эффект молекулярного сита. Обычно используют более разбавленные гели, чем с белком, поскольку размер молекул нуклеиновых кислот большой. Разделение нуклеиновых кислот в геле зависит от их вторичной структуры. Применяя электрофорез стандартных нуклеиновых кислот с известной молекулярной массой, можно определить массу неизвестного образца. Нуклеиновые кислоты окрашиваются на электрофореграммах метиленовым синим.

Максимальное разделение компонентов достигается с помощью диск-электрофореза. При этой методике в заполненной колонке в различных ее частях неодинаковы размеры пор геля и значение pH. В верхней части колонки находится так называемый концентрирующий гель с крупными порами и буфером низкой ионной силы с определенным pH. Нижний гель — разделяющий. Он мелкопористый, с другим значением pH, большой ионной силой. В такой системе происходит эффект концентрирования белков на границе верхней и нижней зон и разделение их в нижней. Эффект концентрирования сочетается с эффектом молекулярного сита.

После разделения гели удаляются из трубки, окрашиваются соответствующими красителями для продуктов разделения. Гели можно фотометрировать, разрезать на части и элюировать

отдельные зоны для количественного определения.

Метод имеет высокую разрешающую способность, не требует больших количеств материала для анализа, разделение происходит быстро (30–60 мин). Особенно эффективен для анализа многокомпонентных смесей. Применяется и для испытания чистоты препаратов.

2.4.2. Изоэлектрофокусировка

Изоэлектрофокусировка представляет собой модификацию электрофореза. С помощью этого метода разделяют вещества с амфотерными свойствами, имеющие разные изоэлектрические точки. К таким соединениям относятся белки, заряд молекулы которых зависит от pH среды.

Методика изоэлектрофокусировки состоит в том, что смесь белков вносят в колонку с гелем — носителем, насыщенным раствором полиамфолитов, представляющих собой смесь полиамино-поликарбоновых кислот. Обычно такая смесь имеет pH 6,5, но при наведении электрического поля в колонке с гелем в ней создается линейный градиент pH от 3 до 10, в котором под действием электрического поля и передвигаются заряженные молекулы белков. В изоэлектрических точках движение их прекращается. Таким образом, отдельные белки концентрируются или фокусируются в своих изоэлектрических точках в определенных зонах геля.

Метод используют для аналитических и препаративных целей. К его достоинствам относятся значительное концентрирование белков и высокая разрешающая способность.

2.4.3. Иммуноэлектрофорез

Еще одной модификацией электрофореза является иммуноэлектрофорез, который проводят на пластинках агара или агарозы. Метод сочетает электрофоретическое разделение белков с иммунопреципитацией в геле.

Различают одномерный и ракетный иммуноэлектрофорез. При одномерном — на пластинке с гелем делают ямку и желобок для антигенов и антител соответственно. В ямку вносят смесь антигенов и проводят их разделение. После окончания электрофореза в желобок вносят антисыворотку. Антисыворотка и антигены диффундируют через гель. Каждый антиген дает дугу преципитации с гомологичным антителом. По числу и положе-

нию преципитатных линий можно судить об антигенном спектре смеси.

Ракетный электрофорез основан на миграции антигенов в геле, содержащем антитела, и на специфичной иммунопреципитации антигенов с соответствующими антителами.

Иммунофоретическое разделение превосходит остальные методики по чувствительности и разрешающей способности. Используется, например, для количественного анализа известных белков в различных органах растений.

Литература

Бауэр Г., Энгельгард Х., Хеншен А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. М., 1988. 688 с.

Боуэн Т. Введение в ультрацентрифугирование. М., 1973. 248 с.

Васильев А. Н. Теоретические основы хроматографических методов в биохимическом анализе. Киев, 1979. 43 с.

Детерман Г. Гель-хроматография. М., 1970. 251 с.

Дин П., Джансон У., Мидл Ф. Аффинная хроматография. М., 1988. 278 с.

Златкис З., Кайзер Р. Высокоэффективная тонкослойная хроматография. М., 1979. 245 с.

Литвинов Л. Д., Руденко Б. А. Газовая хроматография в биологии и медицине. М., 1971. 283 с.

Маурер Г. Диск-электрофорез. М., 1971. 247 с.

Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М., 1981. 286 с.

Ригетти П. Изоэлектрическое фокусирование. Теория, методы, применение. М., 1986. 398 с.

Урванцева Г. А., Рязанова А. В., Титова В. А., Черняковский Ф. П. Хроматографические методы исследования в биологии. Ярославль, 1983. 177 с.

Фритц Д., Гьерде Д., Поланд К. Ионная хроматография. М., 1984. 224 с.

Глава 3

АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И АППАРАТУРА

В биологии в настоящее время приобретает решающее значение выяснение количественных характеристик изучаемых объектов. Для этого используют методы, хорошо разработанные в физике, а также в аналитической и физической химии. В данной главе будут рассмотрены наиболее часто применяемые в физиологии растений аналитические методы, даны некоторые элементы их теоретического обоснования, а также приведены принципиальные схемы приборов, позволяющих точно определять исследуемые параметры.

3.1. ОБЪЕМНЫЙ АНАЛИЗ

Объемный анализ часто применяют при количественном определении веществ. Сущность объемного анализа сводится к измерению объема раствора известной концентрации, затраченного в ходе реакции с раствором (веществом), концентрацию которого требуется определить. Количество вещества в граммах, содержащееся в 1 мл (см^3) раствора, называется титром. Раствор, титр которого точно известен, называется стандартным или титрованным.

Правило (закон) эквивалентности: химические элементы или их соединения вступают в реакции друг с другом в строго определенных весовых количествах, соответствующих их химическим эквивалентам; т.е. грамм-эквивалент одного вещества реагирует с грамм-эквивалентом другого.

При анализе титрованный раствор постепенно приливают к исследуемому раствору до тех пор, пока не будет установлено, что затраченное количество реактива эквивалентно количеству определяемого вещества. Этот процесс называется титрованием. Титрование заканчивается, когда взаимодействующие вещества прореагируют в строго эквивалентных количествах. Для определения конца титрования необходимо установить момент наступления эквивалентности. Точку эквивалентности в неокрашенных растворах устанавливают с помощью индикаторов, изменяющих свою окраску в ходе титрования. При рабо-

те с окрашенными или мутными растворами применение индикатора невозможно, поэтому в таких случаях следят за изменением физико-химических свойств раствора при титровании. Точку эквивалентности можно определить, измеряя, например, электропроводность раствора (кондуктометрическое титрование) или его окислительно-восстановительный потенциал (потенциометрическое титрование). Последнее основано на том, что изменение концентрации ионов в растворе приводит к сдвигу потенциала на электроде, погруженном в титруемый раствор. Вблизи точки эквивалентности происходит скачок потенциала.

Таким образом, одно из необходимых условий применения объемного анализа состоит в возможности фиксации точки эквивалентности. Другим условием является сдвиг реакции в одну сторону (обратная реакция должна идти в незначительной степени). Помимо этого, в титровании используют только те реакции, которые идут с достаточной скоростью. Если реакции идут медленно, фиксировать точку эквивалентности трудно, а иногда невозможно. И наконец, не должны идти побочные реакции, осложняющие точное вычисление результатов анализа.

В объемном анализе используются различные типы реакций: нейтрализации, окисления-восстановления, осаждения и комплексообразования.

3.1.1. Метод нейтрализации

Ход процесса титрования удобно выражать с помощью кривых титрования, показывающих зависимость изменений pH среды от количества добавленного рабочего раствора. Для получения кривой титрования строят график в прямолинейных осях координат. По оси абсцисс откладывают количество (мл) прибавленного раствора титранта, по оси ординат — значение pH среды.

Рассмотрим случай, когда 20 мл 0,1 н. раствора HCl титруется 0,1 н. раствором NaOH. Кислотность титруемого раствора HCl равна 1. Для того чтобы увеличить pH на 1 (т.е. концентрацию H^+ уменьшить в 10 раз), нужно оставить только 10% из 100% соляной кислоты (за 100% принимается исходный объем кислоты, равный 20 мл); т.е. 90% HCl необходимо нейтрализовать щелочью. Таким образом, к 20 мл HCl необходимо прилить 18 мл NaOH, при этом значение pH раствора будет равно 2; неоттитрованными остаются 2 мл HCl. Для того чтобы уменьшить

концентрацию H^+ еще в 10 раз, нужно вновь нейтрализовать 90% оставшейся после первого титрования кислоты. Для этого добавляется еще 1,8 мл щелочи, и величина pH раствора становится равной 3. При нейтрализации оставшихся 0,2 мл HCl (добавление 0,18 мл NaOH) происходит дальнейшее увеличение pH до 4. Теперь в растворе остается 0,02 мл не нейтрализованной кислоты, т.е. 0,5 капли. Если прибавить 1 каплю NaOH, то в растворе окажется такой же избыток OH^- , каким до этого был избыток H^+ , т.е. величина pH станет равной 4, следовательно, значение pH будет равно 10. Таким образом, добавление последней капли приводит к скачку pH от 4 до 10, при этом концентрация ионов H^+ изменяется в 10 000 раз. Это резкое изменение pH называется скачком титрования. В данном случае в качестве индикаторов могут быть использованы те вещества, у которых область перехода окраски находится в интервале pH от 4 до 10, т.е. лакмус, фенолфталеин, метилоранж. При работе с более разбавленными растворами скачок титрования будет меньше, например при титровании 0,01 н. раствора кислоты 0,01 н. раствором щелочи скачок титрования будет находиться в диапазоне pH 5–9. В данном случае метилоранж применять нельзя, следует использовать только лакмус и фенолфталеин.

Титрование слабой кислоты сильной щелочью (или сильной кислоты слабой щелочью) вызывает сдвиг точки эквивалентности в щелочную или кислотную сторону соответственно. Если слабая кислота титруется сильной щелочью, скачок титрования наблюдается в диапазоне pH 7,74–10,00. Титрование многоосновных кислот сопровождается несколькими скачками титрования, соответствующими нейтрализации каждой кислотной группы. При титровании слабого основания сильной кислотой скачок титрования происходит в диапазоне pH 6,26–4,00. Если же слабая кислота титруется слабой щелочью, скачка титрования не наблюдается. Следовательно, хотя бы одно из титруемых веществ должно быть сильным электролитом.

Одним из самых важных условий титрования является правильный выбор индикатора. Индикаторы - это вещества, позволяющие установить точку эквивалентности. При правильном выборе индикатора изменение его физико-химических свойств (окраски) происходит вблизи точки эквивалентности и совпадает с конечной точкой титрования.

В зависимости от типа используемой реакции при титровании индикаторы подразделяются на следующие группы: кис-

лотно-основные, окислительно-восстановительные (дифениламин), комплексонометрические (эрихром черный Т), адсорбционные (реагирующие на изменение концентрации ионов, осаждаемых в виде малорастворимых соединений, например, флуоресцеин и эозин), радиоактивные, хемилюминисцентные, флуоресцентные, флотационные и др.

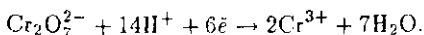
3.1.2. Оксидиметрия

К окислительно-восстановительным методам титрования относятся такие методы, конечные стадии которых завершаются реакциями окисления — восстановления. Окислительно-восстановительные методы, наряду с кислотно-основными методами титрования, очень широко применяются в практике научно-исследовательских лабораторий. Этими методами можно определять самые разнообразные неорганические и органические вещества. С помощью оксидиметрии определяют содержание многих элементов, разнообразных неорганических, органических и элементоорганических соединений, мономеров, полимеров, минеральных удобрений, лекарственных и медицинских препаратов. Широкому применению методов оксидиметрии в практике способствуют многие их достоинства, в том числе высокая точность, хорошая воспроизводимость результатов и быстрота анализа. Окислительно-восстановительные методы можно применять в сочетании с методами кислотно-основного и комплексонометрического титрования, а также с методами предварительного разделения и концентрирования веществ.

3.1.2.1. БИХРОМАТОМЕТРИЯ

Одним из методов оксидиметрии является бихроматометрия — метод титрометрического анализа, основанный на использовании в качестве стандартного водного раствора бихромата калия.

Бихромат калия в кислой среде является довольно сильным окислителем:



При этом желто-зеленая окраска бихромата переходит в зеленую. Из приведенного выше уравнения следует, что эквивалент бихромата равен его молекулярной массе, деленной на шесть:

$$\mathcal{E}_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} = \text{M}_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} / 6,$$

или

$$\Theta_{K_2Cr_2O_7} = 294 : 6 = 49,03 \text{ г.}$$

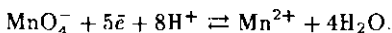
Так как восстановление ионов бихромата происходит с участием протонов, титрование проводят в кислой среде, создаваемой за счет добавления серной, соляной или фосфорной кислот. Бихромат способен окислять многие органические и неорганические вещества: Fe^{2+} , Mn^{3+} , Mn^{4+} , V^{3+} , W^{3+} , Mo^{5+} , Ti^{3+} , сульфит, дитионат, гексоцианоферрат, арсенит, иодид, спирты, гидрохиноны, глицерин, аскорбиновую кислоту, тиомочевину. Бихромат также может использоваться для определения окислителей (U^{6+} , V^{5+} , Mo^{6+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , NO_3^- , H_2O_2) после их предварительного восстановления.

В бихроматометрии применяют следующие методы определения конечной точки титрования:

- 1) безиндикаторный метод, основанный на изменении окраски титруемого раствора;
- 2) индикаторный метод, основанный на применении окислительно-восстановительных (дифениламин, фенилантрапилиновая кислота), хемилюминисцентных (силоксен) и других индикаторов;
- 3) инструментальные методы: потенциометрия, кондуктометрия, амперометрия.

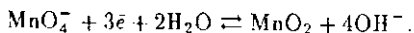
3.1.2.2. ПЕРМАНГАНАТОМЕТРИЯ

Основным веществом, применяемым в перманганатометрии, является перманганат калия. Обычно титрование проводят в кислой среде. Схема реакции:



Перманганат в кислой среде легко окисляет щавелевую, сернистую, сероводородную, азотистую кислоты, а также перекись водорода, гексоцианоферраты, тиосульфаты, роданиды и ряд ионов: Fe^{2+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} и др. Если вещества окисляются медленно, проводят так называемое обратное титрование, т.е. к определяемому веществу добавляют избыток перманганата, а затем остаток оттитровывают раствором восстановителя, например щавелевой кислотой.

В щелочной среде перманганатом легко окисляются форматы, иодиды, цианиды и многие другие органические соединения:



Преимущество метода перманганатометрии заключается в том, что конечная точка титрования может быть установлена без индикатора, по обесцвечиванию раствора перманганата. Титрование может проводиться как в кислой, так и в щелочной среде. В кислой среде окислительно-восстановительный потенциал системы очень высок:

$$E^{\circ}_{\text{MnO}_4^-/\text{Mn}^{2+}} = +1,52 \text{ в.}$$

Это позволяет определять большее число веществ, чем другими методами окислительно-восстановительного титрования.

К недостаткам перманганатометрии относится неустойчивость стандартных растворов перманганата: при хранении изменяется их титр. Перманганат трудно получить в химически чистом виде, требуется обязательная проверка его титра, например, по щавелевой кислоте, приготовленной из фиксаля. Титрование перманганатом не рекомендуется проводить в присутствии ионов Cl^- , которые окисляются до Cl_2 . И наконец, некоторые реакции при комнатной температуре идут медленно, для их ускорения требуется нагревание, что не всегда возможно, например, при титровании летучих и разлагающихся при нагревании соединений.

3.1.3. Манометрия

Манометрический способ определения газообмена относится к физико-химическим методам и основан на регистрации чувствительным манометром поглощения (или выделения) объектом какого-либо газа по изменению давления в замкнутом сосуде при постоянной температуре.

Обычно манометрический аппарат, например аппарат Варбурга, представляет собой термостатированную ванну, снабженную специальным механизмом для укрепления набора сосудов с манометрами и приведения их в колебательное движение. Существуют три основных варианта манометрического метода: манометрия при постоянном объеме, постоянном давлении и дифференциальная манометрия.

Манометрия при постоянном объеме — вариант, когда объем газа в сосудике и температура поддерживаются постоянными, а изменение количества газа оценивается по изменению давления. По этому принципу действует манометр Варбурга. Этот манометр состоит из U-образной капиллярной трубки, соединенной у основания с сосудом, содержащим манометрическую

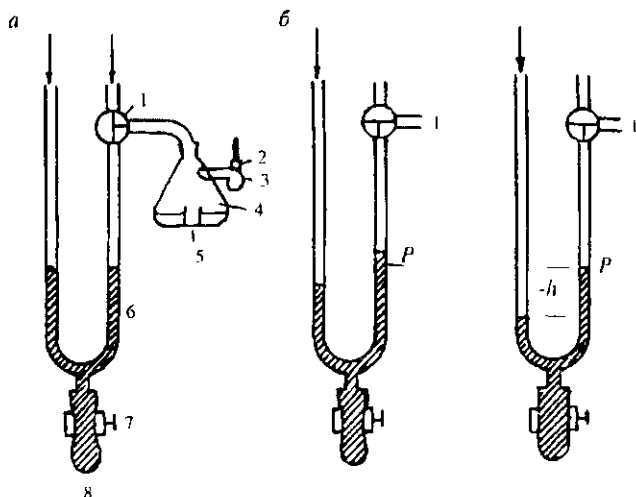


Рис. 3.1. Манометр Варбурга.

1 — трехходовый кран, 2 — пробка бокового сосуда с газовым краном, 3 — боковой сосудик, 4 — колба, 5 — центральный цилиндр, 6 — манометрическая жидкость известной плотности, 7 — регулировочный винт, 8 — резервуар с манометрической жидкостью. P — точка сравнения, h — изменение давления манометрической жидкости (мм ртутного столба) в процессе поглощения газа. Стрелками указано атмосферное давление.

жидкость. Правое колено манометра соединяется с сосудиком, хорошо смазанным стеклянным шлифом, а левое колено открыто и сообщается с атмосферным воздухом. За U-образной трубкой расположена миллиметровая шкала, по которой можно регистрировать изменения уровня жидкости в открытом колене манометра. На правом колене в месте, примерно соответствующем середине шкалы, нанесена точка сравнения, к которой подводят уровень жидкости в правом колене перед тем, как снимать показания. Это гарантирует проведение всех измерений при постоянном объеме (рис. 3.1).

В соответствии с конкретными особенностями конструкции

сосудик может иметь один или несколько боковых отростков. Колбу сосудика погружают в термостатированную ванну. В ходе эксперимента уровень жидкости в правом колене манометра регулярно подводят к точке сравнения и замеряют уровень жидкости (h) в левом колене. Поскольку на уровень жидкости в левом колене будут влиять незначительные естественные колебания температуры и давления, применяют термобарометр — контрольный манометр с сосудиком, в котором реакционная смесь заменена равным объемом буферного раствора или воды. Колебания показаний термобарометра используются для коррекции результатов.

Изменение уровня манометрической жидкости (h) связано с количеством выделившегося или поглощенного газа (x) следующим уравнением:

$$x = h \left[\frac{V_r \cdot \frac{273}{T} + V_l \alpha}{P_0} \right],$$

где V_r — объем, занимаемый газом, включая объем капилляра от сосудика до точки сравнения (мм^3); V_l — объем жидкости в сосудике (мм^3); α — растворимость газа (кислорода или двуокиси углерода) в жидкости, находящейся в сосудике (выражается в объеме, мм^3 , газа, растворенного в 1 мм^3 жидкости при стандартных условиях состояния равновесия при парциальном давлении P_0); P_0 — стандартное давление (мм манометрической жидкости); T — температура водяной бани (градусы Кельвина).

Удельный вес манометрической жидкости обычно доводят до $1,034 \cdot 10^{-3} \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$ (используя, например, жидкость Броди) так, что $P_0 = 10\,000 \text{ мм}$. Поскольку для каждого сосудика все величины, стоящие в скобках в уравнении, постоянны, можно записать $x = h_k$, где k — постоянная сосудика, которую можно определить, проведя калибровку манометров и рассчитав по уравнению.

3.2. ОСНОВЫ ВЕСОВОГО АНАЛИЗА

Гравиметрический (весовой) метод количественного анализа основан на измерении массы определяемого вещества или его составных частей, выделяемых в химически чистом состоянии или в виде соединений точно известного состава.

Методы весового анализа разделяют на три большие группы: методы выделения, осаждения и отгонки.

В методах первой группы определяемый компонент выделяют количественно в свободном состоянии из анализируемой пробы и взвешивают на аналитических весах. Например, для определения количества золы в растительном или почвенном материале навеску образца сжигают и прокаливают до постоянной массы в муфельной печи в предварительно взвешенном тигле. Оставшуюся после прокаливания в тигле золу взвешивают и по ее массе вычисляют процентное содержание золы в исследуемом материале. Взвешивание проводят на одних и тех же весах при температуре весов (тигли остужают в эксикаторах над хлоридом кальция).

Методы осаждения заключаются в том, что изучаемый компонент с помощью определенных химических процессов переводится в труднорастворимое соединение, которое выпадает в осадок точно известного состава. Осадок промывают и высушивают. После прокаливания осадка до постоянной массы (в муфельной печи) получается так называемая весовая форма, которую взвешивают. Следует отметить, что при прокаливании вещество осадка может переходить в другое химическое соединение. В этом случае форма осаждения и весовая форма существенно различаются. По массе весовой формы можно рассчитать количество изучаемого компонента, вступившего в реакцию. Эта группа методов применяется для анализа ионов кальция, бария, тяжелых металлов.

Различают три варианта метода отгонки.

1. Определяемое вещество отгоняют из смеси и образовавшийся отгон взвешивают.

2. Определяемое вещество отгоняют, поглощают каким-либо поглотителем и взвешивают поглотитель. По прибавке массы определяют количество отгона.

3. Определяемое вещество отгоняют из точной навески, после окончания отгонки остаток навески снова взвешивают, по разнице в массе определяют количество отогнанного вещества.

Методом отгонки определяют влажность веществ, которую рассчитывают по разнице масс до и после высушивания навески до постоянной массы.

В ходе весового анализа проводят следующие характерные для этого метода операции: отбор средней пробы, взятие навески, растворение, осаждение определяемого вещества, фильтрование, промывание осадка, его высушивание и прокаливание, вычисление результатов.

3.3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Физические и физико-химические методы анализа обычно делятся на электрохимические, спектральные (оптические), хроматографические, радиометрические и масс-спектрометрические.

3.3.1. Электрохимические методы

К этим методам анализа относятся следующие:

Электрогравиметрический анализ, основанный на выделении из растворов электролитов веществ, осаждающихся на электродах при прохождении через раствор постоянного электрического тока. Выделившийся при электролизе металл (окисел) взвешивают. Разновидностью электрогравиметрического анализа является метод внутреннего электролиза, в котором используется электрический ток, возникающий при погружении в анализируемый раствор двух электродов, составляющих гальваническую пару, например, Zn и Pt . Выделившееся на электродах вещество взвешивают.

Кондуктометрия — измерение электропроводности анализируемых растворов, которая зависит от концентрации электролита, его температуры и физико-химических свойств.

Потенциометрия — измерение потенциала электрода, погруженного в анализируемый раствор. Потенциал электрода изменяется в зависимости от концентрации соответствующих ионов.

Полярграфия — измерение силы тока, изменяющейся в зависимости от напряжения в процессе электролиза, в условиях, когда один из электродов имеет очень малую поверхность. При полярграфии таким электродом являются капли ртути, вытекающие из очень тонкого отверстия капиллярной трубки, а также платиновый (вращающийся), графитовый, серебряный или какие-либо другие электроды.

Кулонометрия — измерение количества электричества, израсходованного на электролиз вещества, которое необходимо проанализировать.

К электрохимическим методам анализа также можно отнести *амперометрическое и высокочастотное титрование*. Высокочастотное титрование позволяет обойти недостатки, свойственные кондуктометрии, вызванные, например, поляризацией электродов или изменением их электропроводности вследствие осаждения твердых частиц при титровании по методу осаждения. Этот эффект достигается тем, что при высокочастотном

титровании электроды помещают вне анализируемого раствора — непосредственно у стенок измерительной ячейки, а частоту переменного тока повышают до нескольких мегагерц.

Для амперометрического титрования применяют полярографическую установку; но ее используют не для определения концентрации анализируемого вещества, а для определения точки эквивалентности в процессе титрования. Аликвоту исследуемого раствора помещают в электролизер, снабженный капельным ртутным катодом и большим ртутным анодом. Между электродами устанавливают заданное напряжение и приступают к титрованию, отмечая показания гальванометра и объем стандартного раствора. Затем строят кривую амперометрического титрования, по которой находят точку эквивалентности. Количество определяемого вещества вычисляют по объему стандартного раствора реагента, израсходованного до достижения точки эквивалентности.

В биологических исследованиях обычно применяют потенциометрию, полярографию и кондуктометрию.

3.3.1.1. ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ

Потенциометрия — измерение электрического потенциала, возникающего на электродах, опущенных в раствор с анализируемым веществом. Суть метода заключается в измерении э.д.с. гальванического элемента, состоящего из индикаторного (селективного) электрода и электрода сравнения.

Наиболее широкое применение нашел стеклянный электрод для определения pH . Вслед за ним были созданы ионоселективные электроды со стеклянными мембранами для определения концентрации щелочных металлов и алюминия. В настоящее время на основе твердых и жидких ионообменников, нейтральных переносчиков и монокристаллов созданы электроды на K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , La^{3+} , NH_4^+ , Cd^{2+} , Cs^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , NO_3^- , Cl^- , Br^- , S^{2-} , CN^- , CO_3^{2-} , ClO_4^- .

Существуют газочувствительные потенциометрические датчики на CO_2 , NH_3 , SO_2 , H_2S , а также ферментные электроды, с помощью которых можно анализировать органические соединения.

В качестве электрода сравнения чаще используют каломельный или хлорсеребряный электрод с насыщенным раствором хлористого калия. Если попадание ионов хлора и калия в изучаемый раствор нежелательно, используют солевой мостик, за-

полненный другим электролитом. Ионоселективный электрод с насыщенным хлорсеребряным электродом составляют гальванический элемент с переносом.

Внутренний вспомогательный электрод	Внутренний раствор постоянного состава	Мембрана	Исследуемый раствор	KCl насыщенный	KCl насыщенный AgCl
Ионоселективный электрод			Электрод сравнения		

Зависимость э.д.с. (E) элемента с переносом от активности (a_i) определяемого иона в растворе выражается уравнением Нернста:

$$E = E^0 + \frac{2,3 \cdot RT}{Z_i \cdot F} \lg a_i,$$

где E^0 — стандартное значение э.д.с. элемента ($E = E^0$ при $a=1$), R — газовая постоянная, T — температура (K°), F — число Фарадея, Z_i — заряд иона. Из уравнения следует, что при изменении содержания определяемого иона в растворе в 10 раз э.д.с. (E) элемента меняется на 59,14 мВ в случае однозарядного иона и на 29,5 мВ для двухзарядного иона при температуре $25^\circ C$. Как видно из уравнения Нернста, непосредственно определяемой величиной является не концентрация (C_i), а активность (a_i) иона в растворе, связанная с концентрацией через коэффициент активности γ :

$$a_i = C_i \cdot \gamma_i.$$

При сильном разбавлении растворов значение γ приближается к 1 ($\gamma \rightarrow 1$), в этом случае значение активности электролита становится равным величине его концентрации ($a_i = C_i$).

Для проверки работы электродов проводят калибровку гальванического элемента по стандартным растворам. При работе в растворах сложного ионного состава для калибровки необходимо применять стандартные растворы, близкие по составу к исследуемым.

Потенциал электродов обычно измеряют компенсационным способом или с помощью высокоомных усилителей постоянного тока типа ЛПУ-01, рН-340, рН-673, ЭВ-74, рН-121 и т.п.

Изменение э.д.с. гальванического элемента, составленного из ионоселективного электрода и электрода сравнения, правильное оценивать компенсационным методом с помощью потен-

циометров постоянного тока Р-307, Р-37 и т.п. В компенсационной схеме эталоном служит нормальный элемент Вестона. В качестве нуль-индикатора при этом используется высокоомный усилитель постоянного тока. Значение э.д.с. исследуемого элемента снимают на потенциометре в момент компенсации.

3.3.1.2. КОНДУКТОМЕТРИЯ

Кондуктометрия основана на способности растворов электролитов проводить электрический ток. Величина электрического тока, проходящего через раствор, зависит от концентрации электролита. Способность электролитов проводить электрический ток в растворах оценивают величиной удельной и эквивалентной проводимости.

Удельная электропроводность — электропроводность 1 н. раствора, заключенного между плоскими электродами площадью 1 см², находящимися на расстоянии 1 см друг от друга.

Эквивалентная электропроводность — удельная электропроводность 1 н. раствора электролита. Электропроводность раствора электролита зависит не только от его концентрации, но и от подвижности ионов. Наиболее высокой подвижностью обладают ионы H^+ и OH^- .

Известно несколько методов кондуктометрического анализа.

Прямая кондуктометрия позволяет определять концентрации растворов путем измерения электропроводности раствора электролита с известным составом.

Кондуктометрическое титрование — определение содержания вещества по излому кривой титрования. Кривая строится по данным измерения удельной электропроводности анализируемого раствора, изменяющейся в результате химических реакций в процессе титрования.

Хронокондуктометрическое титрование — определение содержания вещества по затраченному на его титрование времени.

Кондуктометрический анализ проводят с помощью кондуктометров — приборов, измеряющих электрическое сопротивление растворов. По величине сопротивления (R) легко определить электропроводность растворов (L): $L = 1/R$.

Кондуктометры построены по мостовой схеме (рис. 3.2). Платиновые электроды, помещенные в ячейку с раствором, включают в одно плечо моста. В другое плечо моста включено постоянное известное сопротивление (R_C). В диагонали моста

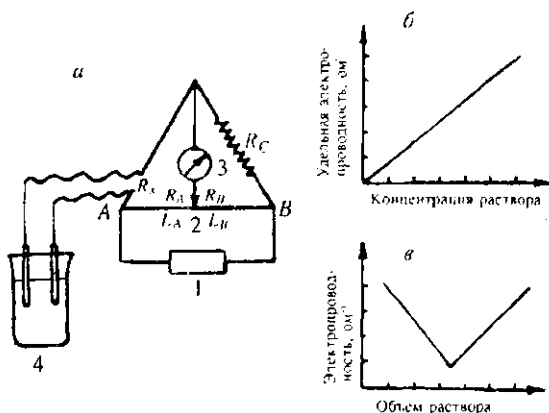


Рис. 3.2. Схема кондуктометра (а); калибровочный график (б) и кривая кондуктометрического титрования (в).

1 — звуковой генератор, 2 — реохорд, 3 — нуль-прибор, 4 — ячейка и электроды. R_C — постоянное сопротивление, R_X — сопротивление ячейки, R_A и R_B — сопротивление плеч реохорда, L_A и L_B — длина плеч реохорда.

находится гальванометр (измерительный нуль-прибор). Мост уравнивают с помощью реохорда. К точкам А и В моста подключают электрический ток и, передвигая движок реохорда, ищут точку, в которой измерительный прибор покажет отсутствие напряжения. В этот момент сопротивление ячейки R_X так относится к постоянному сопротивлению R_C , как сопротивление плеча реохорда R_A относится к сопротивлению плеча R_B :

$$\frac{R_X}{R_C} = \frac{R_A}{R_B}, \quad \text{отсюда} \quad R_X = \frac{R_A R_C}{R_B}.$$

Отношение R_A к R_B равно отношению длин плеч реохорда L_A/L_B .

Определив R_X , легко рассчитать электропроводность раствора. Например, при сопротивлении раствора 130 Ом электропроводность равна

$$L = \frac{1}{R} = \frac{1}{130} = 0,0077 \text{ Ом}^{-1}.$$

Для составления калибровочного графика измеряют электропроводность серии растворов известной концентрации и затем определяют удельную электропроводность (x):

$$x = \frac{L \cdot d}{S},$$

где L — электропроводность раствора; S — площадь электродов; d — расстояние между электродами. Рассчитав по формуле удельную электропроводность, строят калибровочный график зависимости удельной электропроводности от концентрации (рис. 3.2). Затем измеряют электропроводность анализируемого раствора, рассчитывают его удельную электропроводность и по графику определяют концентрацию раствора.

Чаше всего используют кондуктометрическое титрование. При этом в ячейку с электродами вводят анализируемый раствор и титруют раствором известной концентрации при перемешивании. После добавления каждой порции титранта (например по 1 мл) измеряют электропроводность раствора в ячейке и строят график зависимости между ней и объемом титрованного раствора. В точке эквивалентности наблюдается перегиб кривой титрования, при котором электропроводность раствора имеет минимальное значение.

Кондуктометрический метод позволяет проводить измерение концентрации веществ не только в прозрачных, но в окрашенных и мутных растворах, в присутствии окислителей и восстановителей, анализировать не только водные, но и неводные, а также смешанные водно-органические растворы.

Кондуктометрия позволяет определять неорганические и органические соединения (в том числе и газообразные), используя разнообразные типы реакций (нейтрализации, осаждения, присоединения, замещения, окислительно-восстановительные, компенсации, омыления и т.д.), сопровождающиеся изменением электропроводности анализируемых растворов.

3.3.1.3. ПОЛЯРОГРАФИЯ

Метод полярографии основан на анализе вольт-амперных кривых, которые описывают зависимость величины тока, протекающего через раствор, от приложенного напряжения. Если в раствор с веществом опустить два электрода и приложить потенциал, то на них начнутся электрохимические процессы окисления и восстановления. Потенциалы, при которых начнут

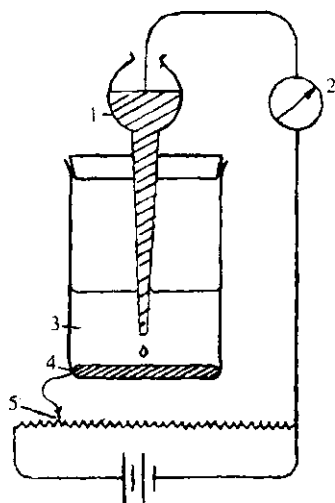


Рис. 3.3. Простейшая полярографическая цепь.

1 — капельный ртутный электрод, 2 — гальванометр, 3 — исследуемый раствор, 4 — ртутный анод, 5 — потенциометр.

происходить эти процессы, будут отличаться от равновесных потенциалов, так как на электроды накладывается внешний потенциал. Это явление называется поляризацией электродов (от этого термина и произошло название метода).

Полярография применяется для анализа веществ, способных электрохимически восстанавливаться или окисляться на поверхности электродов. Это чрезвычайно чувствительный метод, позволяющий работать с очень разбавленными растворами и небольшими объемами.

Классическая полярографическая ячейка состоит из двух электродов — индикаторного и вспомогательного (который одновременно является токопроводящим и электродом сравнения), погруженных в раствор электролита (рис. 3.3). В качестве индикаторного используют ртутный каплюющий электрод. Это тонкий стеклянный капилляр, наполненный ртутью. На его кончике, который погружен в раствор, периодически возникают и отрываются ртутные капли, выполняющие роль электрода с

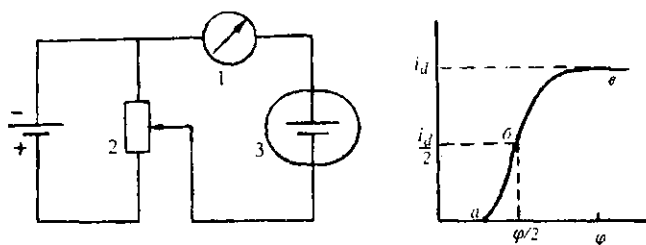


Рис. 3.4. Принципиальная схема полярографа (слева) и зависимость плотности электрического тока (i_d) от потенциала (φ).

1—гальванометр, 2—делитель напряжения, 3—полярографическая ячейка. Объяснения в тексте.

непрерывно обновляющейся поверхностью. Роль вспомогательного электрода выполняет слой ртути, налитой на дно сосуда, либо каломельный электрод, соединенный с электролитом через солевой агаровый мостик.

При определении катионов или способных к восстановлению нейтральных частиц индикаторный электрод должен быть заряжен отрицательно, он выступает в роли катода. В амперометрических ячейках используются не ртутные электроды, а электроды из твердых металлов. Условия восстановления на них кислорода имеют ряд особенностей, поскольку при этом не происходит перемешивания раствора, создаваемого периодически отрывающимися каплями ртути, а также обновления поверхности электрода. Амперометрическая ячейка для определения кислорода принципиально не отличается от полярографической, однако особенности работы в амперометрическом режиме (т.е. при постоянном значении потенциала индикаторного электрода, отвечающем середине площадки предельного тока) вызывают определенные ограничения.

Рассмотрим простую электрическую схему (рис. 3.4), которая позволяет гальванометром измерять силу тока, проходящего через ячейку при разном напряжении.

Напряжение создается источником тока и меняется делителем напряжения в гальванической цепи, состоящей из рабоче-

го и вспомогательного электродов. При подаче напряжения в гальванической ячейке происходит изменение потенциала обоих электродов и в результате прохождения тока возникает падение потенциала (E) в растворе:

$$E = V_a - V_k + I \cdot R,$$

где V_a и V_k — потенциалы анода и катода, R — сопротивление раствора, I — сила тока. Экспериментатор интересуется процессом, протекающим на рабочем электроде (катоде), со скоростью, зависящей от потенциала V_k . Введение в раствор индифферентного электролита (KCl) позволяет снизить сопротивление раствора настолько, что можно пренебречь величиной $I \cdot R$. Если в системе используются вспомогательные электроды, потенциалы которых не меняются при прохождении тока сравнительно небольшой плотности (каломельные, водородные, галогеносеребряные и т.д.), то можно считать, что все приложенное напряжение затрачивается на изменение потенциала рабочего электрода: $E = -\Delta V_k$. Это позволяет опытным путем установить зависимость между I и V_k .

Полярографический анализ базируется на использовании закономерностей диффузной кинетики, т.е. кинетика электрохимической реакции на рабочем электроде определяется ее медленными стадиями (подводом реагирующих частиц из объема раствора к поверхности электрода и удалением продуктов реакции в объем раствора), имеющими диффузный характер.

Если в растворе содержится некоторое вещество A , способное восстанавливаться на электроде в вещество B , и скорость этого превращения зависит от скорости диффузии молекул A к электроду, то зависимость силы тока от потенциала будет иметь вид кривой, называемой полярографической волной, или полярографической кривой, или вольт-амперной кривой (рис. 3.4). При начальных значениях величина потенциала электрода (участок a) еще недостаточна для осуществления электрохимической реакции и сила тока равна нулю. Концентрация вещества A у поверхности электрода (C_A^S) не отличается от таковой в глубине раствора (C_A^0). При смещении потенциала электрода в сторону отрицательных значений начинается электролиз, скорость которого растет быстрее, чем скорость смещения потенциала (участок b). Электролиз вызывает увеличение тока в цепи. При превращении A в B поверхностная концентрация C_A^S становится меньше объемной. В результате возникает диффу-

зионный процесс, направленный на выравнивание концентрации вещества A и обеспечивающий подачу A к электроду.

Скорость диффузионного процесса выражается первым законом Фика:

$$i = nFD_A \frac{C_A^0 - C_A^S}{\delta_A},$$

где i — скорость процесса, выраженная величиной плотности тока; n — число электронов, участвующих в процессе; F — число Фарадея; D_A — коэффициент диффузии вещества A ; δ_A — толщина диффузионного слоя. По мере смещения потенциала C_A^0 падает, а i — возрастает. Наконец при поверхностной концентрации C_A^S равной нулю, скорость процесса становится максимальной и перестает зависеть от потенциала электрода (участок ϵ). Такую силу тока, при которой достигается полный разряд всех ионов анализируемого вещества, поступающих в приэлектродное пространство за счет диффузии, называют предельным или диффузионным током (i_d). Величина диффузионного тока прямо пропорциональна коэффициенту диффузии D_A и обратно пропорциональна толщине диффузионного слоя δ_A :

$$i_d = nFD_A \frac{C_A^0}{\delta_A}.$$

Величина D_A постоянна для данных частиц в растворе. Величина δ_A является функцией коэффициента диффузии, кинематической вязкости раствора и скорости движения жидкости. Для снижения величины δ_A раствор перемешивают, что резко уменьшает толщину диффузионного слоя и увеличивает предельный ток диффузии. Необходимо строго соблюдать определенный режим перемешивания растворов, для поддержания которого используют магнитные мешалки или вращающиеся электроды. Скорость диффузионного процесса не зависит от природы электрода. Полярографическая волна характеризует качественный и количественный состав анализируемой пробы. Величина потенциала, при которой значение диффузионного тока составляет половину предельного, называется потенциалом полуволны. Потенциал полуволны является характерным свойством химического элемента и служит основой качественной полярографии. Величина предельного тока диффузии пропорциональна концентрации определяемого вещества в растворе и является

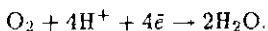
основой количественной полярографии. Зависимость силы предельного диффузионного тока от концентрации вещества выражается уравнением:

$$I = 605n \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot \tau^{1/6} \cdot C,$$

где I — сила тока, мкА; n — число электронов, принимаемых ионом при восстановлении; D — коэффициент диффузии иона, $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$; m — масса ртути, вытекающей из капилляра за 1 с, мг; τ — период капания, с (время «жизни» одной капли); C — концентрация определяемого иона, мМ. Если в исследуемом растворе содержатся ионы одного типа, то n и D являются величинами постоянными.

Скорость движения ионов под действием электрического тока зависит от многих факторов: разности потенциалов между электродами, размера и заряда анализируемых ионов, их концентрации, что может искажать процесс полярографического анализа. Для улучшения качества определения иона создают полярографический фон (или просто фон). Для этого в исследуемый раствор добавляют другую соль, ионы которой не разлагаются при данном потенциале, но являются носителями зарядов.

Амперометрия представляет собой полярографический анализ, при котором на электродах поддерживается заданное напряжение, требуемое для выделения на катоде определяемого вещества. Амперометрию в биологии чаще всего применяют для определения концентрации кислорода. При этом используются платиновые вращающиеся или неподвижные (типа Кларка) электроды. Восстановление O_2 происходит по уравнению:



В ходе физиологического опыта концентрация кислорода в растворе постоянно меняется, так как его поглощает изучаемый биологический объект. При этом регистрируется изменение предельного тока диффузии, что дает представление о концентрации O_2 и соответственно о динамике окислительных процессов в клетках и их органоидах. В случае использования электродов из твердых металлов необходимо периодически очищать их рабочую поверхность. Калибровку полярографической ячейки для определения концентрации кислорода обычно проводят по стандартному биологическому объекту (дрожжам).

3.3.2. Спектральные методы исследования

Спектральные (оптические) методы основаны на изучении спектров излучения, поглощения и рассеивания.

Эмиссионный спектральный анализ — изучение эмиссионных спектров (спектров испускания или излучения) элементов, входящих в состав анализируемого вещества. Этот метод позволяет определять элементный состав вещества.

Пламенная спектрофотометрия, или фотометрия пламени состоит в распылении анализируемого вещества в пламени, выделении характерной для определяемого элемента длины волны излучаемого света и измерении его интенсивности.

Атомно-адсорбционный спектральный анализ (атомно-адсорбционная спектроскопия, или атомно-адсорбционная спектрофотометрия) основан на способности свободных атомов металла в пламени поглощать световую энергию при характерных для каждого элемента длинах волн. Этим методом можно определить свыше 70 элементов. Атомно-адсорбционный метод отличается высокой чувствительностью и точностью.

Адсорбционная спектроскопия связана с изучением спектров поглощения исследуемого вещества. Различают спектральный анализ в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях спектра. Адсорбционный спектральный анализ включает спектрофотометрию — определение спектра поглощения или измерение светопоглощения при строго определенной длине волны и колориметрию — сравнение интенсивностей окрасок исследуемого и стандартного окрашенных растворов.

Анализ по спектрам комбинационного рассеивания света (Рамановская спектроскопия, или спектрография) — определение изменения длины волны света, рассеиваемого изучаемой средой, обусловленного молекулярной структурой исследуемого вещества.

К оптическим методам исследования относятся также:

Турбидиметрия — измерение количества света, поглощаемого неокрашенной суспензией. При этом свет, поглощенный раствором или прошедший через него, регистрируют так же, как при колориметрии окрашенных растворов.

Нефелометрия — измерение отражения или рассеивания света окрашенными или неокрашенными частицами взвешенного в растворе осадка. Метод позволяет определить небольшие количества вещества, находящегося в растворе в виде взвеси.

Люминесцентный, или флуоресцентный, анализ — измерение

интенсивности люминесценции веществ, облученных монохроматическим светом.

3.3.2.1. АДСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Молекулы поглощают свет. Поглощение света (длина волны и количество) зависит от структуры и окружения молекулы. Когда кванты света сталкиваются с молекулой, они либо рассеиваются (т.е. изменяется направление распространения света), либо поглощаются. В последнем случае энергия квантов света передается молекуле, которая переходит в возбужденное состояние. Молекула или ее часть, которая может быть возбуждена при облучении светом, называется хромоформом.

Обычно энергия возбужденной молекулы превращается в тепло (кинетическую энергию) в результате столкновения, например с молекулой растворителя. В некоторых случаях энергия вновь излучается в ходе люминесценции или флуоресценции.

Молекулы возбуждаются в широком диапазоне длин волн. Измерение в каждом спектральном диапазоне проводят с использованием специального оборудования. Для большинства молекул длины волн, вызывающие переход из основного состояния в возбужденное, лежат в ультрафиолетовой, видимой части спектра и инфракрасной области. Рамановские спектры (спектры комбинационного рассеивания) обусловлены изменениями, происходящими в ближней инфракрасной области. Спектры электронного парамагнитного резонанса и ядерного магнитного резонанса являются отражением изменений направления вращения соответственно электронов и ядер в магнитном поле.

При прохождении света через равномерно поглощающую среду его исходная интенсивность (I_0) уменьшается (до величины I). Отношение интенсивностей света, прошедшего через среду, и падающего называется пропусканием T ($T = I/I_0$). Поглощение, или экстинкция E — это величина, равная $\lg(I_0/I)$.

Согласно закону Ламберта—Бэра, экстинкция пропорциональна концентрации поглощающего вещества и толщине образца, т.е. $E = \epsilon cd$, где ϵ — коэффициент молярной экстинкции поглощающего вещества при определенной длине волны, c — молярная концентрация раствора, d — оптический путь или толщина кюветы, сантиметры.

Пропускание (T) обычно измеряется в процентах или долях единицы и меняется от 0 до 100% (1,0). Экстинкция (E) —

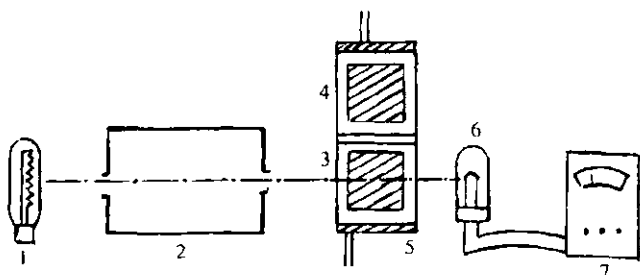


Рис. 3.5. Устройство спектрофотометра.

1 — лампа, 2 — монохроматор, 3 — кювета с анализируемым раствором, 4 — кювета с растворителем, 5 — держатель кювет, 6 — фотоэлемент, 7 — измерительный прибор (регистрирующее устройство).

величина безразмерная и варьирует от 0 до бесконечности. Поскольку коэффициент молярной экстинкции (ϵ), как правило, довольно велик, для расчетов используют другую величину $E_{1\%}^{1\text{см}}$ — поглощение света образцом, содержащим однопроцентный раствор исследуемого вещества в кювете толщиной 1 см.

Спектр поглощения вещества представляет собой зависимость количества поглощенной системой энергии от длины волны. В биохимических исследованиях наиболее часто используется измерение спектров поглощения веществ в видимой и ультрафиолетовой областях (200–700 нм), которое осуществляют с помощью спектрофотометра.

Несмотря на различные конструкции все спектрофотометры состоят из источника света, монохроматора (для выделения определенной длины волны), прозрачной кюветы (куда помещается образец), детектора света и регистрирующего измерительного прибора (рис. 3.5). Некоторые модели спектрофотометров снабжены самописцами, позволяющими проводить запись (развертку) спектров поглощения веществ.

Ход работы на спектрофотометре заключается в том, что при одной и той же длине волны измеряют интенсивность света, прошедшего через растворитель, а затем — интенсивность света, прошедшего через изучаемое вещество, находящееся в том же растворителе. Далее фиксируется изменение в интенсивно-

сти света, по которому судят о поглощении светового потока растворенным веществом. На практике прибор настраивают таким образом, чтобы он показывал нулевое поглощение при измерении прохождения света только через растворитель. Осуществив такую настройку, удобно снимать показания, так как они соответствуют поглощению анализируемого образца.

Для того чтобы измерять изменение поглощения вещества в зависимости от длины волны светового потока, применяют так называемые регистрирующие спектрофотометры, которые позволяют оценивать не только изменение поглощения с течением времени при постоянной длине волны, но также записать спектр поглощения вещества.

Многочувствительные регистрирующие спектрофотометры регистрируют одновременно поглощение образца и растворителя при двух (или более) выбранных длинах волн.

3.3.2.2. ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Инфракрасная область электромагнитного излучения делится на ближнюю инфракрасную (1–2 мкм), инфракрасную (2–25 мкм) и дальнюю инфракрасную (25–250 мкм) области. В биохимических исследованиях наиболее часто применяется область 2,5–20 мкм.

Инфракрасные спектры возникают в результате так называемых характеристических движений (колебаний) атомов и функциональных групп (например, метильной, карбоксильной, амидной и др.) в молекуле, приводящих к деформации химических связей, их растяжению, изменению дипольного момента и величины углов между связями, другим еще более сложным изменениям. Ценность спектрального анализа в инфракрасной области обусловлена тем, что колебания каждой функциональной группы в молекуле очень чувствительны к изменениям ее структуры (химической) и конформации. Весьма полезен для аналитических целей тот факт, что поглощение света группой атомов в молекуле зависит от их окружения — частоты колебаний инфракрасного спектра смещаются в ту или иную сторону. Поскольку инфракрасные спектры — это колебательные спектры, их принято строить в частотах (см^{-1} и с^{-1}), а не длинах волн. С помощью спектрального анализа этого типа удастся различать колебания C–H связи в группах $=\text{CH}_2$ и $-\text{CH}_3$. Спектры поглощения веществ в инфракрасной области абсолютно специфичны, их иногда называют "отпечатками пальцев" молекулы. Некото-

рые полосы в инфракрасных спектрах молекул появляются при одних и тех же частотах и соответствуют одинаковым группам атомов в молекуле. Такие группы частот — важный элемент при анализе спектров изучаемых соединений.

Инфракрасные спектрофотометры принципиально не отличаются от спектрофотометров, работающих в ультрафиолетовом и видимом свете. Источником излучения является тело, нагреваемое до 1500–1800°C. Для выделения определенной длины волны используется монохроматор, но в качестве детектора применяется термопара (вместо фотоэлемента).

Основная трудность инфракрасной спектрофотометрии заключается в том, что нельзя использовать водные растворы вследствие сильного поглощения H_2O в инфракрасной области спектра. Поэтому используют тяжелую воду (D_2O), смесь H_2O и D_2O или хлороформ. Наиболее частым приемом является применение тонких, достаточно сухих пленок, которые готовят, растворяя анализируемые вещества в летучем растворителе, после чего дают возможность растворителю испариться на плоской пластинке. Обычно инфракрасная спектрофотометрия применяется в сочетании с ядерным магнитным резонансом и масс-спектроскопией.

3.3.2.3. КОЛОРИМЕТРИЯ

Колориметрия основана на сравнении интенсивности окраски анализируемой среды со стандартными растворами. Различают субъективные (визуальные) и объективные (с помощью фотоколориметра) методы.

К визуальным методам относятся методы стандартных серий (шкалы окрасок), дублирования и уравнивания. В биологических исследованиях чаще применяют метод стандартных серий и фотоколориметрию.

Примерами метода стандартных серий являются определение кислотности растворов с помощью рН-индикаторной бумаги и универсального индикатора Алямовского.

Метод фотоколориметрии основан на инструментальном измерении интенсивности светового потока, прошедшего через окрашенный раствор. Экстинкция раствора прямо пропорциональна его концентрации и толщине слоя. Окрашенный раствор поглощает различные длины волн белого света неравномерно, поэтому для увеличения чувствительности и точности метода используют не весь спектр видимого света, а только

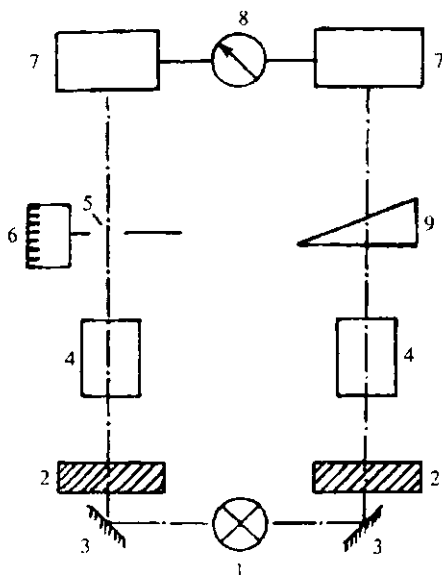


Рис. 3.6. Схема фотоэлектроколориметра.

1 — лампа, 2 — светофильтры, 3 — зеркала, 4 — кюветы, 5 — диафрагма, 6 — отсчетный барабан, 7 — фотоэлементы, 8 — гальванометр, 9 — оптический клин.

ту часть, которая наиболее интенсивно поглощается раствором. Для выделения этой части спектра используют светофильтры, пропускающие только узкий пучок лучей определенной части спектра. Светофильтр должен быть подобран таким, чтобы наблюдалось максимальное поглощение света окрашенным исследуемым раствором. Поэтому для растворов, окрашенных в желтый цвет, применяют синие (450–480 нм) светофильтры, в красный — сине-зеленые (490–500 нм), в синий — желтые (575–590 нм) и т.д.

Для измерения интенсивности светового потока используют фотоэлементы, которые преобразуют световую энергию в электрический ток.

Схема фотоколориметра (рис. 3.6) составлена таким образом,

что свет от лампы с помощью двух зеркал делится на два параллельных потока одинаковой интенсивности. Каждый световой поток проходит через светофильтр и кювету с раствором анализируемого вещества (или кювету с растворителем) и попадает на фотоэлемент. Электрический ток, вырабатываемый фотоэлементом, поступает на гальванометр, где регистрируется разность электрических токов. Интенсивность обоих световых потоков уравнивается с помощью оптических клиньев и диафрагмы, связанной с отсчетным барабаном. В момент равенства световых потоков гальванометр устанавливается на нуле, и по шкале отсчетного барабана определяется экстинкция раствора. Кюветы, применяемые в фотоколориметрии, готовят из кварцевого стекла определенной толщины, которая учитывается при расчетах. Различные типы фотоколориметров отличаются типами фотоэлементов, способом измерения фототока, количеством светофильтров; могут работать и в видимой, и в ультрафиолетовой частях спектра.

При массовых фотоколориметрических анализах удобно пользоваться калибровочной кривой. Для ее построения готовят серию стандартных растворов разной концентрации и измеряют экстинкцию этих растворов. Строят график зависимости экстинкции от концентрации стандартных растворов. Далее, измеряя в тех же условиях экстинкцию исследуемого раствора, по графику определяют его концентрацию.

Основным преимуществом фотоколориметрии является относительная простота и высокая скорость анализа. С целью повышения точности фотоколориметрических определений можно использовать спектрофотометр.

С помощью нефелометрических и турбидиметрических методов измеряют интенсивность рассеянного (нефелометрия) или поглощенного (турбидиметрия) света коллоидными растворами и взвесями. Эти два метода различаются тем, что при нефелометрии регистрируется та часть светового потока, которая рассеивается под прямым углом частицами, имеющими линейные размеры больше длины волны проходящего через взвесь света, а при турбидиметрии измеряется степень ослабления интенсивности светового потока, прошедшего через раствор, содержащий нерастворимые частицы.

В нефелометрии, турбидиметрии и колориметрии могут использоваться одни и те же приборы — фотоэлектроколориметры и спектрофотометры. Однако для нефелометрических измере-

ний применяют специальные приборы — нефелометры, принцип работы которых аналогичен принципу работы колориметров, с той лишь разницей, что при нефелометрии наблюдают не проходящий, а рассеянный свет, для чего наблюдения проводят сбоку. Расчет концентраций веществ при этом проводят с помощью калибровочных графиков, которые строят на основе стандартных суспензий или мутных растворов.

Нефелометрические и турбидиметрические методы анализа менее точны, чем фотоколориметрические, их используют, например, для определения сульфатов, хлоридов, численности бактериальных клеток или микроводорослей, а также других нерастворимых взвесей. Для удержания нерастворимых частиц в дисперсном состоянии (чтобы они не выпали в осадок) применяют желатин, крахмал и другие высокомолекулярные прозрачные вещества.

3.3.2.4. СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЯ

Методы спектрофлуориметрии позволяют определять содержание флуоресцирующих веществ в растворе и различных биологических системах — интактных клетках, органеллах, микросомальной фракции, различных модельных объектах. Основным преимуществом спектрофлуориметрии является возможность работы с нативными объектами, относительно высокая чувствительность, регистрация динамики процессов. Спектрофлуориметрический анализ основан на количественном измерении интенсивности флуоресценции объектов в определенных участках спектра.

Флуоресценция (испускание света) возникает при освещении светом с длиной волны, вызывающей переход молекул в возбужденное состояние. По правилу Стокса длина волны флуоресценции больше длины волны возбуждения. Интенсивность флуоресценции зависит от концентрации флуоресцирующих молекул, интенсивности возбуждающего света, молярного коэффициента поглощения и величины квантового выхода флуоресценции:

$$I_{\lambda\phi} = 2,3 \cdot I_{\lambda\nu} \cdot \epsilon_{\lambda} \cdot K_{\lambda} \cdot Z \cdot l,$$

где I_{ϕ} — интенсивность флуоресценции, z — концентрация флуоресцирующего вещества, I_{ν} — интенсивность возбуждающего света, ϵ_{λ} — молярный коэффициент поглощения, K_{λ} — квантовый выход флуоресценции, l — длина оптического пути в объекте. Это уравнение справедливо при поглощении объектом менее

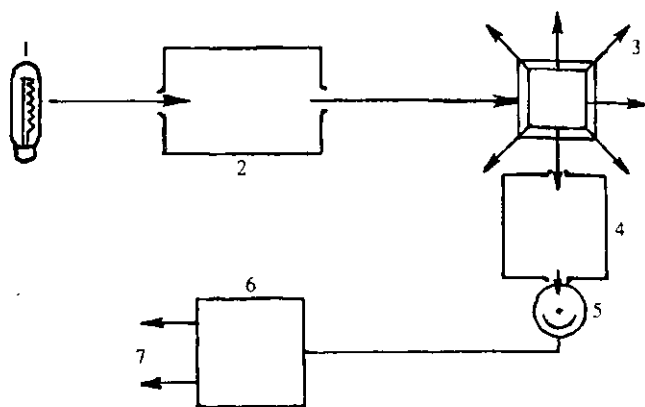


Рис. 3.7. Схема спектрофлуориметра.

1 — источник света, 2, 4 — монохроматоры, 3 — анализируемый образец, 5 — фотоэлектроумножитель, 6 — усилитель, 7 — выход на самописец.

5% возбуждающего света, что обычно имеет место в биологических исследованиях.

Для спектрофлуориметрии применяют флуориметры, спектрофлуориметры, микроспектрофлуориметры и микрофлуориметры. Спектрофлуориметры и микроспектрофлуориметры позволяют измерять спектры возбуждения и флуоресценции суспензий клеток, органелл и мембранных везикул. Флуориметры обеспечивают регистрацию интенсивности флуоресценции только при фиксированных длинах волн. Микроспектрофлуориметры и микрофлуориметры собраны на базе микроскопа.

Интенсивность флуоресценции сильно зависит от температуры и при уменьшении ее от 30 до 20°C снижается на 10–50%, поэтому при измерениях необходимо тщательно контролировать температуру.

Спектрофлуориметр (рис. 3.7) состоит из источника света, двух монохроматоров, детектора, в качестве которого обычно используется фотоумножитель, и усилителя. Для регистрации спектра возбуждения образца его освещают светом различных длин волн, поворачивая монохроматор M_1 , и измеряют флуоресценцию при постоянной длине волны флуоресценции (моно-

хроматор M_2 неподвижен). Спектр флуоресценции снимают при неподвижном монохроматоре M_1 (в этом случае образец освещается светом постоянной длины волны), измеряя флуоресценцию при различных длинах волн за счет перемещения монохроматора M_2 . Во флуориметрах монохроматоры заменены светофильтрами.

3.3.2.5. ПЛАМЕННАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

Атомы веществ, испаряемые в пламени, испускают или поглощают кванты света определенной длины волны. Пламенная спектрофотометрия позволяет по интенсивности специфических для данного элемента линий в спектре устанавливать количество отдельных элементов в веществе.

С наибольшей вероятностью элементы поглощают и испускают свет тех длин волн, которые соответствуют наиболее близко расположенным энергетическим уровням. Поскольку переходы, которые могут совершать электроны в атоме, зависят от расположения занятых и свободных энергетических уровней, атомные спектры для разных элементов строго индивидуальны.

Свет, испускаемый атомами в пламени горелки, можно разложить на набор линий в спектроскопе, спектрографе и спектрофотометре. Эти приборы различаются по способу регистрации спектра (визуально, на фотопленке, с помощью фотоэлемента). Количество испускаемого света пропорционально числу возбужденных атомов, которое в свою очередь зависит от температуры и состава пламени. Для калибровки используют стандартный раствор солей. Ионный состав пламени очень важен: натрий, например, дает очень большую фоновую эмиссию, поэтому его обычно измеряют в первую очередь и добавляют в одинаковых количествах ко всем стандартным растворам.

Соли хлора более летучи, следовательно, исследуемые растворы должны содержать избыток соляной кислоты. Щелочные металлы усиливают эмиссию связанных с ними атомов, тогда как фосфаты, силикаты и алюминаты дают недиссоциирующие соли, тем самым подавляя эмиссию кальция и магния. Эту трудность можно преодолеть, добавив в пробу лантан или стронций. Поскольку хорошо вымытое стекло даже высшего качества связывает и одновременно высвобождает ионы металлов, рекомендуется хранить образцы и стандартные растворы в полиэтиленовой посуде.

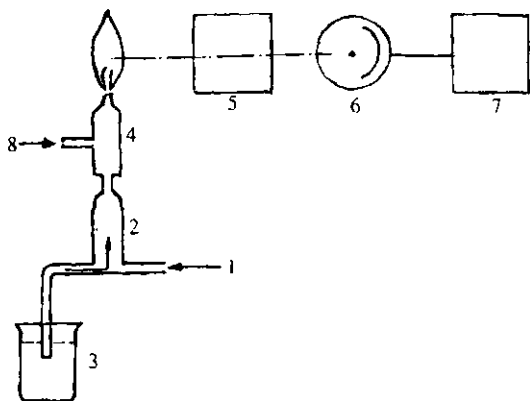


Рис. 3.8. Схема работы пламенного эмиссионного спектрофотометра.

1 — подача воздуха для распыления и сжигания образца, 2 — распылитель, 3 — подача анализируемого раствора, 4 — горелка, 5 — монохроматор или фильтр, 6 — детектор, 7 — регистрирующее устройство, 8 — подача горючего газа для сжигания образца.

Для определения металлических ионов в биологических препаратах необходимо сначала сжечь органические молекулы.

Работа атомного (пламенного) эмиссионного спектрофотометра (рис. 3.8) состоит в следующем. В распылителе (обычный пульверизатор) сжатый воздух (1), проходя через капилляр, захватывает раствор с образцом (3). Образующиеся капли разного размера вместе с потоком воздуха попадают в пламя горелки (4). Для определения конкретных элементов применяются различные составы газовых смесей (табл. 3.1). Спектр испускания анализируемого элемента выделяют, используя монохроматор (5). Однако для простых рутинных определений натрия, калия и кальция можно вместо монохроматора использовать интерференционные фильтры. Детекторами (6) обычно служат фотоэлементы, но, к сожалению, нестабильность пламени уменьшает их потенциальную точность. При некоторых рутинных измерениях (эмиссия до шести элементов одновременно) используют многоканальные полихроматоры.

Таблица 3.1. Состав газовых смесей, используемых в пламенной спектрофотометрии для определения различных элементов

Определяемые элементы	Состав смеси	Температура, °C
Na, K	Воздух/природный газ	1500
Na, K	Воздух/пропан	2000
Ca, Mg, Fe	Воздух/ацетилен	2500
Ti, V	Окись азота/ацетилен*	3000

*Используется только в адсорбционном атомном спектрофотометре.

В отличие от эмиссионной пламенной фотометрии, где концентрация вещества в растворе определяется по интенсивности спектра излучения его атомов, в атомно-адсорбционной спектрофотометрии концентрацию элементов в растворе определяют по адсорбции монохроматического света, проходящего через пламя.

Анализируемый раствор вводят в пламя в виде аэрозоля. При этом интенсивность пучка, проходящего через пламя, уменьшается вследствие адсорбции его возбужденными атомами. Так как оптическая плотность пламени в определенных пределах пропорциональна концентрации элемента в растворе, его содержание можно определить по величине фототока анализируемого раствора путем сравнения с величиной фототока серии стандартных растворов.

Для получения узкого пучка света в атомно-адсорбционном спектрофотометре (рис. 3.9) применяется лампа накаливания с двойным монохроматором или разрядная лампа. Разрядная лампа подбирается с учетом определяемого элемента. При анализе спектра образец помещается в металлическую чашку. Распылитель и пламя имеют такие же характеристики, как и в эмиссионном атомном спектрофотометре. В качестве детекторов используются фотоумножители или фотоэлементы. Измерения в основном проводятся при длинах волн от 190 до 850 нанометров.

Флуоресцентная атомная спектрофотометрия аналогична молекулярной флуоресценции, но отличается тем, что флуоресцируют атомы в газе, а не молекулы в растворе. При этом свет испускается атомами, пришедшими в возбужденное состояние не вследствие нагревания образца, а в результате поглощения

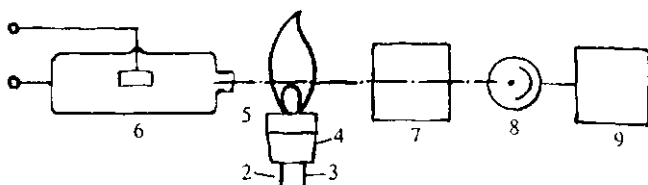


Рис. 3.9. Схема работы атомно-адсорбционного спектрофотометра.

1 — подача анализируемого раствора, 2 — подача газовой смеси, 3 — подача воздуха для сжигания образца, 4 — распылитель, 5 — горелка, 6 — источник света, 7 — монохроматор, 8 — фотоумножитель, 9 — усилитель.

света. Для анализа необходим достаточно интенсивный источник света. В отличие от адсорбционной атомной спектрофотометрии, в данном случае благодаря резонансному поглощению атомов нет необходимости в хорошем монохроматоре. Модуляция усилителя детектора той же частотой, что и у первичного источника напряжения, исключает регистрацию прямого света от пламени.

Флуоресцентная атомная спектрофотометрия имеет очень высокую чувствительность и позволяет, например, обнаруживать цинк и кадмий, когда их содержание в образце составляет $1 \cdot 10^{-10}$ и $2 \cdot 10^{-10}$ частей соответственно.

3.3.2.6. РЕФРАКТОМЕТРИЯ

Этот метод основан на изменении угла преломления светового луча при переходе из одной среды в другую, например из стекла в воду (рис. 3.10). Показатель преломления (n) зависит от природы вещества, длины волны света, температуры и давления. Поэтому точные измерения его проводят в монохроматическом свете при определенных температуре и давлении, указывая подстрочным индексом длину волны, а надстрочным — температуру. Например, n_{489}^{20} означает, что измерения проводили при температуре 20°C и длине волны 489 нм. Если показатель преломления определяется при видимом свете, то указывают только температуру среды.

Степень поляризации зависит от длины волны светового потока и природы вещества. Чем сильнее взаимодействие элек-

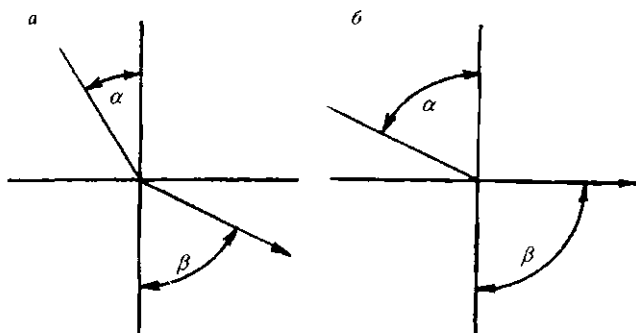


Рис. 3.10. Изменение направления светового потока (лучепреломление) при переходе из одной оптической среды в другую (а) и предельный угол преломления (б). α — угол падения, β — угол преломления.

ромагнитной волны (света) с веществом и меньше скорость ее распространения в среде, тем больше коэффициент преломления. Кванты света, несущие больше энергии, сильнее взаимодействуют с веществом и в большей степени отклоняются от первоначального направления. Следовательно, для фиолетовых лучей коэффициент преломления будет больше, чем для красных.

Показатель преломления (n) для данного вещества при определенных условиях — величина постоянная, равная отношению синуса угла падения светового пучка на поверхность двух сред (α) и синуса угла его преломления (β): $n = \sin \alpha / \sin \beta$.

С повышением концентрации вещества в растворе его показатель преломления увеличивается. Эта зависимость в определенном диапазоне концентраций вещества выражается уравнением: $n = n_0 + kC$, где n_0 — коэффициент преломления чистого растворителя, k — эмпирический коэффициент, зависящий от природы вещества, C — концентрация вещества в растворе.

Для измерения угла преломления света раствором применяют рефрактометры, принцип работы которых основан на измерении предельного угла преломления. Предельным углом преломления называют угол преломления, равный 90° . Предельный угол преломления возникает в определенный момент при

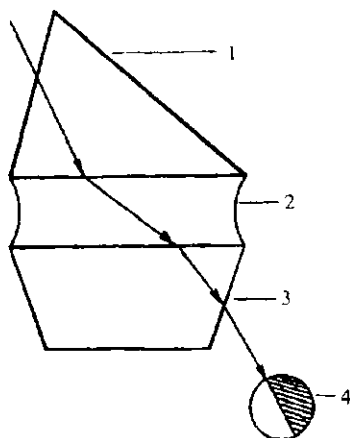


Рис. 3.11. Ход луча света в призмах рефрактометра.
1 — осветительная призма, 2 — исследуемый раствор, 3 — измерительная призма, 4 — граница светотени.

увеличении угла падения, когда луч света, не попадая в среду поглощения, идет по границе раздела фаз (рис. 3.11). При дальнейшем увеличении угла падения наблюдается полное отражение света.

Поскольку между углом падения и углом преломления существует зависимость $N \sin \alpha = n \sin \beta$, то в момент появления предельного угла преломления $\sin \beta = \sin 90^\circ = 1$, и зависимость принимает вид $n \sin 90^\circ = N \sin \alpha$, $n = N \sin \alpha$. Если для одной среды известен показатель преломления (N), то такой показатель для второй среды (n) легко определить, измерив предельный угол падения α . Эту величину определяют по границе света и тени, наблюдаемой в рефрактометре. В качестве одной среды в рефрактометрах используют стекло (стеклянные призмы), для которого показатель преломления известен; второй средой служит жидкость, показатель преломления которой необходимо измерить. Перед проведением измерений показания рефрактометра проверяют по дистиллированной воде, $n_D = 1,3330$. В

простейшем рефрактометре (типа ИРФ-454) раствор вещества помещают между двумя призмами и, вращая призмennую камеру, соединенную с увеличительной трубкой, наводят границу света и тени на центр визирного креста. Затем по шкале отсчитывают величину показателя преломления. Определение концентрации вещества в растворе ведут с помощью калибровочного графика.

3.3.2.7. ПОЛЯРИМЕТРИЯ

Поляризацией называют определение оптического вращения, т.е. вращения плоскости поляризации света раствором оптически активного вещества. Оптическому вращению подвергается поляризованный свет, который отличается от неполяризованного тем, что колебания световых волн в нем происходят только в одной плоскости. В обычном свете колебания происходят во всех плоскостях (рис. 3.12). Плоскость, в которой наблюдаются колебания световых волн поляризованного света, называют плоскостью поляризации.

Поляризованный свет образуется, если лучи света проходят через кристаллы, обладающие оптической неоднородностью и дающие двойное изображение при рассматривании через них различных предметов (исландский шпат, турмалин, поляроидные пленки). В таких кристаллах преломление световых волн в разных плоскостях происходит по-разному. При этом наблюдается раздвоение луча света, причем оба луча поляризованы, но плоскости поляризации у них взаимно перпендикулярны. Следует также отметить, что один из лучей подвергается большему преломлению, чем другой. На этом принципе основано действие призмы Николя, представляющей собой две призмы исландского шпата, склеенные вместе (рис. 3.12).

В поляриметре один луч света проходит через призму Николя, а другой подвергается полному внутреннему отражению. Прошедший через призму Николя (поляризатор) и ставший поляризованным пучок света пропускается через раствор оптически активных веществ. Для измерения угла вращения используется вторая призма Николя (анализатор), которая связана с отсчетным устройством (рис. 3.12).

Все вещества по отношению к поляризованному свету делятся на оптически активные и неактивные. При прохождении поляризованного света через оптически неактивные тела положение плоскости поляризации остается неизменным. Оптически

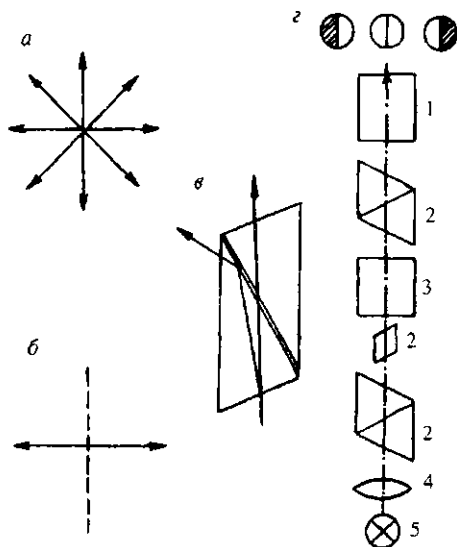


Рис. 3.12. Принцип действия и устройство поляриметра.
 а, б — распространение неполяризованного (а) и поляризованного (б) света; в — прохождение луча света через призму Николя; г — схема поляриметра: 1 — окуляр, 2 — призмы Николя, 3 — кювета с анализируемым раствором, 4 — конденсор, 5 — источник света.

активные соединения вращают плоскость поляризации в правую сторону (по часовой стрелке) или могут быть левовращающими. Угол вращения плоскости поляризации зависит от толщины слоя раствора, через который проходит свет. Если проводить измерения при одинаковых температуре (20°C) и толщине слоя раствора (например, 1 дм), угол вращения плоскости поляризации будет зависеть только от концентрации анализируемых веществ. В стандартных условиях для каждого оптически активного вещества существует определенное значение угла вращения, называемое удельным вращением. Концентрацию вещества вычисляют по формуле:

$$C = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot \alpha_D},$$

где α — угол вращения исследуемого вещества; l — длина трубки, дм; α_D — удельный угол вращения.

К оптически активным соединениям относятся сахара, многие органические кислоты, нуклеиновые кислоты, липиды и др. Если в качестве растворителя используется не вода, а какое-либо другое соединение, а также в ситуациях, когда величина удельного вращения неизвестна, концентрацию анализируемого вещества определяют по калибровочному графику.

Угол вращения плоскости поляризованного света измеряют на поляриметре, который состоит из поляризатора, кюветы с растворенным веществом и анализатора (рис. 3.12). В качестве анализатора и поляризатора служат призмы Николя. Кювета поляриметра представляет собой трубку определенной длины, в торцы которой вставлены стекла. Перед заполнением кювету промывают дистиллированной водой, а затем анализируемым раствором. Заполненную кювету закрывают торцевым стеклом таким образом, чтобы в ней не осталось пузырьков воздуха. Угол поворота плоскости поляризации определяется по равенству освещенности полей, наблюдаемых с помощью окуляра в анализаторе. С анализатором связано отсчетное устройство. Вращая анализатор, уравнивают освещенность полей и на отсчетном устройстве фиксируют угол поворота анализатора.

3.3.3. Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрические методы основаны на разделении потоков ионов, содержащих частицы с разным отношением массы к заряду, в результате комбинированного действия электрического и магнитных полей.

Регистрация разделения ионов достигается электрическим (масс-спектрометрия) или фотографическим (масс-спектрография) способами. Определение отдельных ионизированных атомов, молекул и их радикалов проводят с помощью масс-спектрометров или масс-спектрографов (рис. 3.13). Первым шагом в масс-спектрометрическом опыте является ионизация вещества, при которой наряду с ионами исходного соединения образуются ионизированные "осколки" меньшего молекулярного веса. Как правило, все ионы заряжены положительно, а разделяются они по величине отношения массы к заряду. Этот метод позволяет обнаружить соединение, даже если его доля в образце составляет 10^{-6} . С помощью масс-спектрометрии иногда удается получить полное представление о структуре молекул. Применение

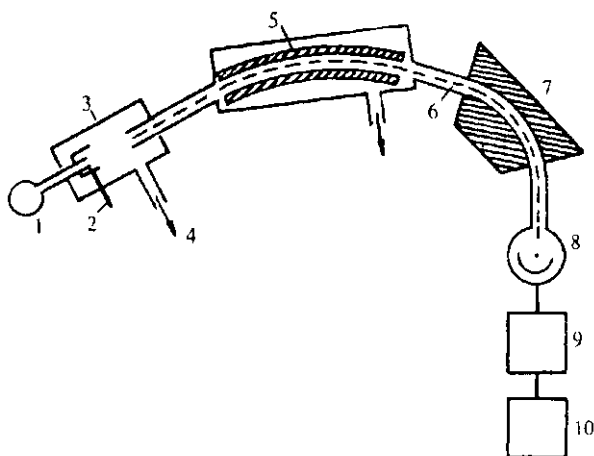


Рис. 3.13. Схема масс-спектрометра.

1 — резервуар с парами образца, 2 — анализируемый образец, 3 — ионизационная камера, 4 — вакуумный насос, 5 — источник электростатического поля, 6 — траектория анализируемых ионов, 7 — магнит, 8 — детектор, 9 — усилитель, 10 — самописец.

этого метода ценно еще и тем, что для эксперимента требуется $10^{-9} - 10^{-6}$ г вещества.

Масс-спектр — это набор пиков разной высоты, соответствующих ионам разной массы, поэтому он не похож ни на один из других электромагнитных спектров. Исходный ион на масс-спектре представлен пиком, отвечающим наибольшей массе (основной пик); однако этот ион вовсе не является преобладающим. Интенсивность линий в масс-спектре обычно выражают в процентах по отношению к интенсивности основного пика. При ионизации, например, двуокиси углерода образуются следующие продукты: CO_2^+ , CO^+ , O_2^+ , O^+ , C^+ ; соответствующие им в масс-спектре линии имеют следующие соотношения массы вещества к его заряду: 44, 28, 32, 16 и 12. В спектре присутствуют и минорные пики, соответствующие другим естественным изотопам тех же фрагментов: $^{13}\text{C}^+$ — 13 и $^{13}\text{CO}_2$ — 15.

3.3.4. Радиометрические методы

Наибольшее значение для изотопного мечения имеют радиоизотопы, испускающие β -частицы (электроны) и γ -лучи (фотоны). При прохождении β -частиц через вещество их энергия рассеивается главным образом в результате ионизации и (или) возбуждения атомов, с которыми они взаимодействуют. Эти процессы регистрируются счетчиками Гейгера-Мюллера (ионизация) или сцинтилляционными счетчиками (возбуждение), которые подробнее будут описаны позже.

Гамма-лучи представляют собой электромагнитное излучение, испускаемое радиоизотопом. Эти лучи не несут заряда и, следовательно, не могут прямо ионизировать атомы. Однако они могут взаимодействовать с орбитальными электронами, выбивая их с орбитали, или с электромагнитным полем ядра, давая пару электрон — позитрон. В обоих типах взаимодействия вторичные электроны, образующиеся под действием γ -фотонов, подобны β -частицам и также способны ионизировать и возбуждать другие атомы. Учитывая это, обнаружение γ -лучей осуществляют в конечном счете с помощью тех же методов, что и β -частиц. Однако на практике для измерения γ -радиоактивности применяют специальные детекторы.

Таблица 3.2. Характеристика изотопов, обычно используемых в биологии

Изотоп	Испускаемая частица	Период полураспада
^3H	β	12,3 года
^{14}C	β	5568 лет
^{24}Na	β, γ	14,97 часа
^{32}P	β	14,2 дня
^{35}S	β	87 дней
^{40}K	β	$1,25 \cdot 10^9$ лет
^{45}Ca	β	164 дня
^{131}I	β, γ	8,1 дня

В любой момент число атомов радиоактивного материала, распадающихся за единицу времени, пропорционально общему числу атомов. Таким образом, если N — число атомов, имеющих во временном интервале t , и dN — число атомов, распадающихся за единицу времени dt , то $dN/dt = \lambda N$, где λ — постоянная распада.

Отсюда, если N_0 — число атомов при $t = 0$, то $N = N_0 e^{-\lambda t}$.

Экспоненциальное уравнение распада указывает на то, что в течение любого интервала времени радиоактивность (скорость распада) препарата будет уменьшаться с одинаковой скоростью. Постоянную распада удобно выражать через период полураспада:

$$\tau = (\ln 2)/\lambda = 0,693/\lambda.$$

Исходя из периодов полураспада, выбирают изотопы для биологических исследований (табл. 3.2). Период полураспада определяет момент, когда необходимо производить измерение, характеризует максимально доступную удельную радиоактивность, а также наиболее удобный изотоп для эксперимента.

3.3.4.1. СУММАРНАЯ РАДИОАКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА

Единицы измерения радиоактивности — кюри; один кюри (Ки) определяется как число распадов в секунду в 1 г радия и эквивалентен $3,70 \cdot 10^{10}$ распадов $\cdot \text{с}^{-1}$. Для большинства биологических задач обычно используют меньшую радиоактивность — милликюри (мКи) или микрокюри (мкКи). На практике в качестве стандартной единицы времени используют минуту, поэтому $1 \text{ мкКи} = 2,22 \cdot 10^6 \text{ расп.} \cdot \text{мин}^{-1}$. В системе СИ за единицу радиоактивности принят Беккерель (Бк). Это очень малая величина, отвечающая одному радиоактивному распаду в секунду, т.е. $1 \text{ Ки} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Бк}$. Обычно радиоактивность выражают в единицах регистрируемых импульсов в минуту, так как счетчики радиоактивности регистрируют не абсолютное число распадов, а только часть из них. Для высокоточных экспериментов при определении абсолютного количества материала вводят коэффициент, отражающий эффективность измерения (счета). Диапазон радиоактивности практически используемых биохимических препаратов лежит в пределах от долей микрокюри до нескольких милликюри (0,1 мкКи - 10 мКи).

Удельная радиоактивность. Препараты радиоизотопов и соединения, меченные изотопами, редко бывают изотопно чистыми, поскольку радиоизотопы обычно разбавлены химически идентичными нерадиоактивными изотопами. Относительное содержание радиоизотопов характеризуется удельной радиоактивностью — скоростью распада на единицу массы. Обычно она выражается как единицы радиоактивности на 1 моль (Ки/моль, мКи/ммоль, мкКи/мкмоль).

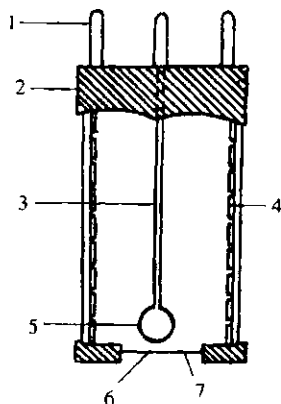


Рис. 3.14. Схема торцового счетчика Гейгера-Мюллера.

1 — контакт катода, 2 — изолированная основа, 3 — анодная нить, 4 — катод — внутренняя металлизированная поверхность счетчика, 5 — стеклянный шарик, 6 — окошко из слюды для входа частиц.

Измерение β -активности за счет ионизации газов. β -Частица, проходящая через газ, способна выбивать орбитальный электрон одного из атомов газа, в результате образуется ионная пара — выбитый электрон и положительно заряженный ион. β -Частица может иметь энергию, достаточную для ионизации нескольких атомов. При ионизации газ становится электропроводным. Если он помещен в камеру, снабженную двумя заряженными электродами, то вторичные электроны и положительные ионы будут двигаться к аноду и катоду соответственно, что можно зарегистрировать в виде очень маленького импульса заряда или тока. β -частица со средней энергией дает 10^2 – 10^3 пар ионов на 1 см пробега, однако не все эти ионы достигают электродов, поскольку ионные пары быстро рекомбинируют. При очень низком напряжении большинство ионов рекомбинирует до того, как они достигнут электродов. С увеличением напряжения захватывается большее число ионов до их рекомбинации. Наконец, дальнейшее возрастание напряжения приводит к тому, что все ионы достигают электродов.

Наиболее распространенный счетчик Гейгера-Мюллера —

так называемый торцевой счетчик (рис. 3.14). Детектор представляет собой цилиндр, внутренняя сторона которого покрыта металлом и служит катодом (4), по оси проходит проволочный анод (3), а в торце расположено окно (6), через которое β -частицы попадают в заполненную газом камеру. Электронная система измеряет ток, возникающий при захвате электронов анодом. Трубка обычно заполнена инертным газом (гелием, неоном, аргоном), к которому добавлено небольшое количество гасящего элемента (бутана, пропана, этанола, хлора или брома) для предотвращения постоянной ионизации.

Большинство трубок Гейгера-Мюллера способно регистрировать от 10^8 до 10^{10} импульсов, прежде чем детектор придет в негодность. Это ограничение может быть устранено, если снабдить трубки отверстиями для входа и выхода и пропускать через трубку непрерывный поток газа.

Чувствительность трубки может быть повышена, если она не имеет закрытого окна, так как многие β -частицы не могут проникнуть через окно, либо, проходя сквозь него, теряют столько энергии, что уже не могут ионизировать газ. Такая модификация известна как проточный счетчик без окна.

3.3.4.2. ИЗМЕРЕНИЕ РАДИОАКТИВНОСТИ ЖИДКОСТНЫМИ СЦИНТИЛЛЯЦИОННЫМИ СЧЕТЧИКАМИ

При данном виде измерения образец растворяют или суспендируют в растворителе, содержащем одно или несколько флуоресцирующих веществ. Испускаемая частица вызывает вспышку света, которая обнаруживается оптическим прибором (фотоумножителем), превращающим свет в электрические импульсы, которые могут быть зарегистрированы. В качестве растворителей используют такие вещества, как толуол, 1,4-диоксан, *n*-ксилон; в качестве флуоресцирующих соединений 2,5-дифенилоксазол (ППО, или РРО англ.) и *n*-бис-[2-(5-фенилоксазол)]-бензол (ПОПОП, или РОРОП англ.). Молекулы ППО выполняют роль "ловушек" энергии возбуждения, переданной β -частицами растворителю. Через некоторое время эта энергия будет высвечиваться в виде квантов света. При этом следует отметить, что максимум спектра флуоресценции ППО лежит в области 363 нм, а максимум спектральной чувствительности ФЭУ обычно находится в области 390–460 нм. Поэтому в раствор вводят еще один сцинтиллятор, у которого спектр флуоресценции сдвинут в более длинноволновую область и совпа-

дает с максимумом спектральной чувствительности фотоумножителя. В качестве такого "вторичного" сцинтиллятора может выступать ПОПОП (максимум флуоресценции которого лежит вблизи 417 нм).

Количественно эффективность счета радиоактивности (в данной постановке опыта) характеризуют отношением числа световых импульсов в минуту, которые регистрирует прибор (N , имп. · мин⁻¹), к числу радиоактивных распадов в исследуемом образце за это же время (D , расп. мин⁻¹): $E = N/D$.

В англоязычной литературе это соотношение записывают так:

$$E = \text{cpm/dpm} (\text{count per min/decomposition per min}).$$

Современные сцинтилляторы позволяют регистрировать β -излучение радиоактивного углерода с эффективностью около 95%, тогда как для трития максимальная эффективность не превышает 60%. Таким образом, описанный выше способ регистрации β -частиц (учет вспышек сцинтилляции) не является стопроцентно эффективным, так как не все β -частицы будут зарегистрированы, однако при достаточно большом числе актов распада сохраняется пропорциональность числа световых импульсов числу β -частиц, снизится лишь "эффективность счета" числа β -распадов.

Возможность регистрации радиоактивности зависит от отношения сигнал/шум. Применение дискриминаторов, осуществляющих анализ амплитуды импульсов, позволяет снизить фоновое излучение до 35 имп · мин⁻¹ без потери эффективности счета.

Тушение сцинтилляции проявляется в снижении числа регистрируемых световых импульсов и уменьшении их интенсивности вследствие содержания в радиоактивном препарате или сцинтилляторе некоторых примесей. Различают тушение химическое (его вызывает вода, кислоты, соли, растворенный кислород), цветовое (окрашенные или поглощающие в ультрафиолете растворы) и тушение, являющееся результатом разбавления (разбавление растворителя и флуоресцента образцом).

3.3.4.3. МЕТОД ИЗОТОПНОГО РАЗБАВЛЕНИЯ

Из радиометрических методов выделяют метод изотопного разбавления, который основан на разбавлении соединения, меченного радиоактивным изотопом, неактивным компонентом

смеси. Для этого к анализируемой смеси добавляют некоторое количество соединения, меченного одним из изотопов и по составу совпадающего с определяемым компонентом. При этом удельная активность соединения, меченного радиоактивным изотопом, уменьшится. Если выделить часть анализируемого вещества, то можно определить конечную удельную активность. Зная начальную и конечную удельные активности, легко вычислить содержание определяемого вещества.

Преимущество метода изотопного разбавления перед другими радиометрическими методами заключается в том, что отпадает необходимость в количественном выделении определяемого вещества. Достаточно выделить лишь его часть в химически чистом виде. Поэтому этот метод особенно ценен в том случае, когда полное выделение исследуемого вещества из анализируемой смеси затруднительно или невозможно.

Рассчитать концентрацию исследуемого соединения можно следующим образом. Если некоторое количество вещества имеет массу W_1 и радиоактивность A , то его удельная активность I_1 будет равна

$$I_1 = A/W_1, \text{ имп} \cdot \text{мин} \cdot \text{мг}^{-1}.$$

При добавлении точного количества такого вещества к определяемой навеске W_2 анализируемого неактивного соединения удельная радиоактивность смеси I_2 будет равна

$$I_2 = A/(W_1 + W_2), \text{ имп} \cdot \text{мин} \cdot \text{мг}^{-1}.$$

Решая систему уравнений, приведенных выше, получим:

$$W_2 = W_1(I_1/I_2 - 1),$$

так как $W = VC$, то

$$V_2 C_2 = V_1 C_1 (I_1/I_2 - 1),$$

где V_1 — объем радиоактивного раствора известной концентрации; V_2 — объем исследуемого раствора; C_2 — концентрация анализируемого раствора.

3.3.4.4. РАДИОАКТИВАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Этот метод заключается в переводе стабильных изотопов элемента в радиоактивные, что позволяет оценить содержание

конкретных элементов в анализируемом образце по "наведенной" радиоактивности. Для этого анализируемые образцы облучают в атомном реакторе. Период полураспада и энергия излучения специфичны для разных изотопов. Измерив радиоактивность и зная время облучения, интенсивность потока облучающих частиц, соответствующие ядерно-физические характеристики определяемого элемента, можно вычислить его весовое количество. Радиоактивационный анализ относится к наиболее высокочувствительным методам аналитической химии.

К числу других радиометрических методов анализа относятся также радиохроматография, нейтронная абсорбциометрия, радиометрическое титрование.

Литература

- Зеленский М. И. Полярографическое определение кислорода в исследованиях по фотосинезу и дыханию. Л., 1986. 140 с.
- Корыта И., Штулик К. Ионоселективные электроды. М., 1989. 267 с.
- Методы практической биохимии/Под ред. Б. Уильямс и К. Уилсон. М., 1978. 268 с.
- Пономарев В. Д. Аналитическая химия. М., 1977. 367 с.
- Практикум по агрохимии/Под ред. Б. Я. Ягодина. М., 1987. 512 с.
- Саламатова Т. С. Определение поглощения кислорода митохондриями и микросомами// Методы изучения мембран растительных клеток. Л., 1986. С. 124.
- Сорочинский В. В., Курганов Б. И. Ферментативные электроды// Итоги науки и техники. Биотехнология. М., Т. 13. 1988. 208 с.
- Фрайфельдер Д. Физическая биохимия// Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии. М., 1980. 582 с.
- Хаваш Е. Ионно- и молекулярно-селективные электроды в биологических системах. М., 1988. 221 с.
- Худякова Т. А., Крешков А. П. Кондуктометрический анализ. М., 1975. 207 с.

Глава 4

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В данной главе представлены методы анализа органических веществ растений, основанные преимущественно на использовании химических свойств этих соединений в сочетании с фракционированием с помощью центрифугирования, хроматографии, электрофореза. Приведенные ниже методы не требуют сложного оборудования, которое, по существу, может быть ограничено центрифугой, спектрофотометром, аналитическими весами, прибором для электрофореза и обычным набором химической посуды. Авторы отдавали предпочтение методам, в которых используются наиболее доступные химические вещества.

4.1. БЕЛКИ

Белки (протеины) — высокомолекулярные (от 6 тыс. до нескольких миллионов) линейные гетерополимеры, состоящие из α -амино-карбоновых кислот, соединенных пептидными связями. В листьях и семенах содержание белков составляет 10–20% сухой массы (3–4% сырой массы), в стеблях — 5–6% сухой массы, в сочных плодах — 0,2–2% сырой массы. Растительные белки сосредоточены в цитоплазме клеток, их содержание в клеточных стенках невелико (1–3% сухой массы вторичной клеточной стенки). В одном растении насчитываются тысячи различных белков. Они отличаются по растворимости, кислотно-щелочным свойствам, размерам, способности к специфическим взаимодействиям с другими молекулами. На этих различиях основаны методы фракционирования белков. Следует учитывать, что белки — очень лабильные соединения, многие из них легко теряют специфические биологические свойства (денатурируют) в кислых и щелочных растворах, в присутствии ионных детергентов, под действием низших амидов, трихлоруксусной кислоты (ТХУ), таннинов, низших спиртов, ацетона, при нагревании. После многочасового кипячения в растворах кислот и щелочей белки гидролизуются до аминокислот.

4.1.1. Экстракция белков из тканей растений

Белки по растворимости делят на водорастворимые альбумины (растворимы также в солевых растворах, разбавленных кислотах и щелочах), солерастворимые глобулины (растворимы также в разбавленных кислотах и щелочах), щелочерастворимые глютенины (растворимы и в разбавленных кислотах). Белки осаждаются этанолом, ацетоном, ТХУ, солями тяжелых металлов, насыщенными солевыми растворами (например, 4 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), таннинами. В семенах злаков есть спирторастворимые запасные белки проламины. В основном белки находятся в цитоплазме клеток в растворе, причем их содержание в смеси может достигать 40%. Таким образом, белки хорошо растворимы в среде с физиологическими концентрациями солей (0,8 - 1%, 0,15 - 0,20 М ионная сила) и нейтральном значении pH.

При гомогенизации растительной ткани, предшествующей экстракции белков, происходит подкисление цитоплазмы в результате выделения кислого клеточного сока из центральной вакуоли, поступления в гомогенат атмосферного кислорода, выделения из вакуолей гидролаз, оксидаз, пероксидаз. Чтобы получить нативные белки, нужно стремиться сохранить те условия, которые были в протоплазме до гомогенизации. Поддержание pH достигается при использовании слабощелочных буферов (pH 7,5 - 8,5). Для снижения окислительных процессов, прежде всего окисления полифенолов оксидазами с образованием темных пигментов, сорбирующихся на белках и инактивирующих ферменты, добавляют восстановители: 2-меркаптоэтанол, дитиотреитол, дитиоэритритол, цистеин, аскорбиновую кислоту. Денатурацию и гидролиз белков можно предотвратить, если вести выделение при 0, +4°C, добавляя ингибиторы протеолиза: фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), пепстатин и др. Если требуется сохранить мембранные структуры, то выделение проводят в изотоническом (0,25 М) или гипертоническом (0,5 - 1 М) растворе сахарозы или глицерина. Чтобы поддержать свойственную цитоплазме (в отличие от вакуоли и клеточной стенки) низкую концентрацию поливалентных катионов, в среду часто добавляют хелатор этилендиаминтетраацетат (ЭДТА, 3 - 5 мМ). Этими правилами руководствуются для получения так называемого грубого ферментативного экстракта. Разработаны методы выделения специфических групп белков. Например, мембранные белки выделяют из фракций мембран солевыми промывками

и обработкой детергентами. Ферменты клеточных стенок также извлекают растворами солей из фракций клеточных стенок. Основные белки хроматина — гистоны — экстрагируют разбавленными кислотами. Запасные белки семян обычно последовательно экстрагируют дистиллированной водой, 1 М NaCl, 0,2–2%-ной щелочью, 60–80%-ным этанолом.

Для определения суммарного количества белков требуется извлечь максимальное количество белков из ткани, не заботясь о сохранении их нативности, а также удалить вещества, мешающие определению белков. Методика может базироваться на дифференциальной экстракции и на дифференциальном осаждении белков. В первом случае ткань предварительно промывают от веществ небелковой природы в условиях, когда белки не растворяются, например, промывают этанолом, этанол/эфиром, ТХУ. Это позволяет удалить липиды, пигменты, фенольные вещества, свободные аминокислоты, нуклеотиды, сахара, крахмал, частично гидролизовать нуклеиновые кислоты. Белки вместе с нуклеиновыми кислотами и гемицеллюлозами растворяют в течение нескольких часов в 0,5–1 н. щелочи. Можно переосадить белок, добавив к экстракту равный объем 20%-ной ТХУ. Во втором случае белки вместе с нуклеиновыми кислотами, полисахаридами, сахарами, аминокислотами, нуклеотидами, пигментами, фенолами извлекают из ткани щелочью с добавлением детергента, а затем избирательно осаждают ТХУ, промывают органическими растворителями и вновь растворяют в щелочи.

4.1.1.1. ПОЛУЧЕНИЕ ГРУБОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ЭКСТРАКТА

Оборудование и реактивы. Центрифуга с охлаждением, центрифужные пробирки, фарфоровая ступка с пестиком.

Буфер для экстракции: 50 мМ трис-оксиметиламинометан — HCl, 1 мМ ЭДТА, 0,1%-ный 2-меркаптоэтанол (pH 7,9).

Ход работы. 2 г свежих или фиксированных жидким азотом проростков кукурузы растирают на холоду (0, +4°C) в ступке с кварцевым песком и 4 мл буфера. Гомогенат переносят в центрифужную пробирку. Ступку дважды промывают буфером (по 1 мл), промывные растворы также сливают в пробирку. Смесь сразу же центрифугируют на холоду в течение 15 мин при 8 тыс.г. Осадок отбрасывают, а центрифугат используют для определения активности ферментов или для фракционирования белков.

4.1.1.2. ВЫДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО КОЛИЧЕСТВА БЕЛКОВ

Оборудование и реактивы. Центрифуга, центрифужные пробирки, фарфоровая ступка с пестиком, пипетки, пробирки, 96%-ный этанол, этанол/диэтиловый эфир (1/1), 10%-ная ТХУ, 0,5 н. NaOH.

Ход работы. 1 г проростков кукурузы растирают в ступке на холоду, переносят в центрифужные пробирки с помощью 10 мл 96%-ного этанола и нагревают 10 мин на кипящей водяной бане. Осадок отделяют центрифугированием при 10 тыс. g в течение 10 мин, супернатант отбрасывают. Затем осадок промывают, последовательно суспендируя и осаждая центрифугированием в 10 мл 10%-ной ТХУ, 10 мл 2%-ной ТХУ, 10 мл воды, 5 мл этанола, 5 мл смеси этанола с диэтиловым эфиром, высушивают при комнатной температуре и в течение ночи экстрагируют 0,5 н. NaOH (2 мл).

4.1.2. Количественное определение белков

Количественное определение белков можно провести, используя особенности их элементарного состава (постоянство доли азота), физико-химические свойства пептидных связей и аминокислотных остатков в молекуле белка, а также способность белковых глобул сорбировать ряд красителей. Методы значительно различаются по чувствительности и специфичности. Например, метод Лоури гораздо чувствительнее биуретового и дает возможность определить количество белка в сильно разбавленном растворе, но он малоспецифичен и требует более тщательной очистки белков от сопутствующих веществ, чем биуретовый метод.

4.1.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ ПО ПОГЛОЩЕНИЮ УЛЬТРАФИОЛЕТА

Все белки поглощают свет в ультрафиолетовой области спектра. Поглощение имеет максимумы при 190 и 280 нм. Пик при 190 нм обусловлен поглощением ультрафиолета гибридной электронной структурой пептидной группы, а при 280 нм — π -электронной системой ароматических аминокислот триптофана и тирозина. Очень многие биологические соединения и компоненты буферов поглощают ультрафиолет (карбоновые кислоты, фенолы, спирты, бикарбонат). Поэтому эти методы применимы только к хорошо очищенным белковым растворам, на-

пример к хроматографическим фракциям белков. Измерению не мешают содержащиеся в среде NaCl (0,9%), фосфаты (5 мМ), сульфаты (50 мМ), поглощение мало зависит от pH в диапазоне pH 2–10.

Оборудование. Спектрофотометр.

Ход работы. Определяют оптическую плотность белкового раствора в воде, 0,1–1 М NaCl или в слабом фосфатном буфере при 280 нм против соответствующего контроля. Удельная экстинкция белков $E_{280\text{нм}}^{1\text{мг/мл}}$ варьирует от 0,4 до 1,5 в зависимости от содержания триптофана и тирозина. Если анализируют смесь белков, то $E_{280\text{нм}}^{1\text{мг/мл}} = 1$. Если анализируют раствор, содержащий белки и нуклеиновые кислоты, то концентрацию белка (C) вычисляют по формуле Варбурга и Христиана: $C(\text{мг/мл}) = f \cdot E_{280\text{нм}}$. Коэффициент f определяют, исходя из отношения $E_{280/260}$ (табл. 4.1). Формулой можно пользоваться, если отношение количества нуклеиновых кислот к белку не превышает 20%.

Таблица 4.1. Коэффициенты f для различных значений соотношения коэффициентов экстинкций при 280 и 260 нм

$E_{280/260}$	Нуклеиновые к-ты, % от суммы белков и нуклеиновых к-т	f	$E_{280/260}$	Нуклеиновые к-ты, % от суммы белков и нуклеиновых к-т	f
1,75	0	1,12	0,82	6,0	0,63
1,52	0,5	1,05	0,78	7,0	0,59
1,36	1,0	0,99	0,75	8,0	0,55
1,16	2,0	0,90	0,73	9,0	0,51
1,03	3,0	0,81	0,71	10,0	0,48
0,94	4,0	0,74	0,65	14,0	0,38
0,87	5,0	0,68	0,59	20,0	0,28

Более сильное поглощение белками дальнего ультрафиолета (190–220 нм) обусловлено пептидными связями. Измерение обычно проводят не в пике поглощения (190 нм), а при 205 или 210 нм, так как при 190 нм свет поглощает молекулярный кислород. Для вычислений используют следующие коэффициенты экстинкций: $E_{205\text{нм}}^{1\text{мг/мл}} = 31$, $E_{210\text{нм}}^{1\text{мг/мл}} = 20$. $E_{205\text{нм}}^{1\text{мг/мл}}$ варьирует от

30 до 35 для разных белков, $E_{210\text{нм}}^{1\text{мг/мл}}$ — от 20 до 24. Различие коэффициентов в значительной степени обусловлено вкладом в поглощение ароматических аминокислот, содержание которых в белках не одинаково. Чтобы точнее определить удельную экстинкцию смеси белков, нужно учесть вклад в поглощение тирозина и триптофана:

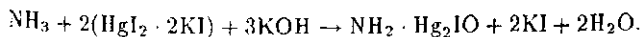
$$E_{205\text{нм}}^{1\text{мг/мл}} = 27 + 120 \cdot \frac{E_{280\text{нм}}}{E_{205\text{нм}}}.$$

Измерять поглощение в дальнем ультрафиолете нужно только с достаточно новыми дейтериевыми лампами в промытых азотной кислотой кварцевых кюветах. При работе со старыми лампами поглощение белков при 205 нм может быть даже меньшим, чем при 210 нм.

4.1.2.2. МЕТОД КЬЕЛЬДАЛЯ

Это традиционный метод определения белкового азота и белка. Содержание азота в белках варьирует незначительно (15–18%) и в среднем составляет 16%. Поэтому, определив количество белкового азота, можно умножением этой величины на средний коэффициент 6,25 вычислить количество белка. В семенах растений содержатся запасные белки, богатые амидами глютамином и аспарагином. Поэтому доля азота у этих белков выше, а пересчетный коэффициент меньше среднего. Для пшеницы и ячменя — 5,70, для риса — 5,95, для ржи — 5,83, для сои — 5,71, для арахиса — 5,46, для подсолнечника, льна, хлопчатника — 5,30.

Навеску растительного материала отмывают от азотсодержащих веществ небелковой природы, выдерживая в подогретой воде, перешедший при этом в раствор белок осаждают ТХУ. Осадок белка сжигают в концентрированной серной кислоте. При этом происходит минерализация белкового азота с образованием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Количество аммиака определяют с помощью реактива Несслера — двойной соли йодистой ртути и йодистого калия ($\text{HgI}_2 \cdot 2\text{KI}$), растворенной в КОН. При взаимодействии реактива Несслера с аммиачным раствором образуется йодистый меркураммоний, окрашивающий раствор в желто-оранжевый цвет:



Содержание в пробе солей кальция, магния, меди, железа, марганца мешает определению, так как эти соли образуют в реакционной среде осадки. Уменьшить действие этих солей можно добавлением в испытуемый раствор сегнетовой соли или цианистого калия перед внесением в него реактива Несслера.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр, колбы Кьельдаля на 50–250 мл или термостойкие пробирки на 20–40 мл длиной 15–20 см; мерные колбы на 50 мл, пипетки, воронки, химические стаканы на 50 мл, калиброванные пробирки на 10 мл, стеклянные палочки, беззольные фильтры, бумажные рН-индикаторы, электроплитка, термостат на 50–60°C.

20%- и 2%-ная ТХУ, 30%-ная H_2O_2 , 50%-ная сегнетовая соль.

Реактив Несслера: раствор хлорной ртути (17 г в 300 мл) вливают в раствор йодистого калия (35 г в 100 мл) до появления исчезающего осадка. Объем раствора доводят до 1 л 20%-ной КОН, опять прибавляют раствор хлорной ртути, пока не появится исчезающий осадок. Жидкости над осадком дают отстояться, прозрачный светло-желтый раствор сливают и хранят в темной склянке в темноте. Реактив Несслера выпускается объединением Реахим.

Ход работы. Навеску хорошо измельченного растительного материала, содержащего 1–3 мг белкового азота (50–100 мг семян и сухих листьев, 0,5–3 г соломы, свежих листьев, корнеплодов, клубней), переносят в стакан на 25 мл и заливают 5 мл теплой воды. Нагревают 30 мин на водяной бане при 40–60°C. Затем добавляют 5 мл 20%-ной ТХУ для осаждения белков. Через 30 мин суспензию сливают на воронку с беззольным фильтром, промывают осадок на воронке 2–3 раза по 5 мл 2%-ной ТХУ. Осадок белка на фильтре подсушивают в термостате при 50–60°C 1–2 ч.

Завернутый в фильтр осадок вносят в колбу Кьельдаля на 50 мл и заливают 3–5 мл концентрированной H_2SO_4 (плотность 1,84). Добавляют несколько капель этанола для предотвращения вспенивания жидкости и 0,5 мл 30%-ной H_2O_2 в качестве катализатора окисления. Колбу, укрепленную в металлической сетке, нагревают на электроплитке до 120–150°C. Когда вспенивание жидкости и бурное выделение белых паров сернистого газа уменьшится, нагрев увеличивают до 250–300°C. После того как темнокоричневый раствор обесцветится (через несколько часов), нагревание продолжают еще 10–15 мин. Раствор охлаждают, переносят в мерную колбу на 50 мл, в которую налито

30–40 мл воды, и доводят его объем водой до метки.

Для определения азота 1 мл пробы переносят в калиброванные на 10 мл пробирки, разбавляют в 6–8 раз водой, нейтрализуют с помощью приблизительно 1 мл 10%-ной КОН или NaOH (проконтролировать pH-индикатором), приливают 0,4 мл 50%-ного тартрата K – Na (сегнетовой соли), затем после перемешивания добавляют 0,4 мл реактива Несслера и доводят водой до метки. При проведении реакции следует избегать яркого света. Через 15 мин раствор колориметрируют при 410–420 нм на спектрофотометре или с синим фильтром на фотоэлектроколориметре (ФЭК). Содержание азота рассчитывают по калибровочному графику, построенному с помощью образцового раствора NH_4Cl или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ для интервала 2–50 мкг азота в 10 мл реакционной среды.

Растворы для колориметрических определений лучше разбавлять не водой, а слабощелочным раствором соды в дистиллированной воде, прокипяченным в течение 10–20 мин для удаления следов аммиака, которые могут быть в дистиллированной воде.

Если анализируют пробы, содержащие меньше 1 мг азота, то сжигание можно провести в 1–2 мл серной кислоты в термостойких пробирках высотой 15–20 см, которые погружают на 7–10 см в ячейки металлического нагревательного блока или в песчаную баню.

При анализе материала, содержащего 20–50 мг азота, белковый осадок заливают 10–20 мл H_2SO_4 в колбах Кьельдаля на 100–250 мл.

Если сжигают белковый раствор, то после добавления концентрированной серной кислоты из раствора кипячением при невысокой температуре выпаривают воду, а затем вносят катализатор и проводят минерализацию, как описано выше.

4.1.2.3. БИУРЕТОВЫЙ И МИКРОБИУРЕТОВЫЙ МЕТОДЫ

Эти методы базируются на свойстве поглощения света комплексом белка и меди в сильно щелочном растворе сульфата меди. Один атом меди координируется четырьмя пептидными группами, что сопровождается потерей протона каждым атомом азота. Название реакции происходит от биурета $\text{NH}_2\text{—CO—NH—CO—NH}_2$, который интенсивно окрашивается щелочной медью. Так как реакция определяется взаимодействием реагента с пептидными группами, то ее вызывают все пепти-

ды и она мало зависит от их состава. Однако если белок богат пролином и оксипролином, которые в полипептиде не имеют имидного водорода и не комплексируют медь, то окрашивание слабое. В реакционной среде не должно быть аммиака и солей аммония, образующих с медью окрашенный комплекс. Среда может содержать детергенты (0,5%), NaCl (1 М), ацетаты (50 мМ), фосфаты (10 мМ), хлорную кислоту (0,5 М), этанол (10%), мочевины (1 М). Свободные аминокислоты, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, сахара в физиологических концентрациях не мешают определению.

Существует несколько модификаций этого метода, имеющих различную чувствительность. Мы приводим стандартный биуретовый метод, который основан на измерении поглощения красно-фиолетового продукта биуретовой реакции при 540 нм, и микрометод, в несколько раз более чувствительный, но и более трудоемкий, состоящий в измерении поглощения комплекса — белок в ультрафиолетовой области спектра при 310 нм.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр.

Раствор А: 1,5 г сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и 6,0 г тартрата калия и натрия ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 500 мл воды, добавляют 300 мл 10%-ной NaOH и доводят объем раствора водой до 1 л. Хранят в пластиковом сосуде при комнатной температуре в течение нескольких месяцев.

Раствор Б: 0,21%-ный $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 30%-ной NaOH (щелочь добавляют к водному раствору медного купороса, иначе выпадает осадок $\text{Cu}(\text{OH})_2$). Хранят в пластиковом сосуде при комнатной температуре в течение нескольких месяцев.

30%-ный раствор NaOH.

Ход работы. К 0,5 мл белкового раствора (0,4–8 мг/мл) добавляют 2,5 мл раствора А. Через 20–30 мин измеряют поглощение при 540 нм против контрольной пробы. Окраска стабильна в течение нескольких часов. Пользуются калибровочной кривой, построенной по белку-стандарту.

В микроварианте к 2 мл белкового раствора (0,03–0,6 мг/мл) приливают 1 мл раствора Б. Через 5 мин измеряют поглощение при 310 нм против контрольной пробы (D_A). К 2 мл белкового раствора приливают 1 мл 30%-ной щелочи и измеряют поглощение при 310 нм против 20%-ной щелочи (D_B). ($D_A - D_B$) — величина, характеризующая количество белка, которое определяют по калибровочной кривой, построенной для белка-стандарта. Оптическая плотность стабильна 2,5 ч.

4.1.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА БЕЛКА С РЕАКТИВОМ ФОЛИНА (МЕТОД ЛОУРИ)

Это самый распространенный метод количественного определения белков. Он основан на взаимодействии фенольного реактива Фолина с белком, предварительно обработанным щелочным раствором меди. Активным компонентом реактива Фолина служит смесь фосфорномолибденово-вольфрамовых кислот: $2\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ и $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

В белковом растворе эти кислоты восстанавливаются, теряя один, два или три атома кислорода из вольфрамата и (или) молибдата, и окрашиваются в синий цвет с максимумом поглощения при 750 нм. Медь хелатируется белками и, очевидно, способствует восстановлению кислот. В этом методе хромогенными являются прежде всего остатки тирозина и триптофана белков, в меньшей степени — остатки цистина, цистеина, гистидина, определенный вклад в развитие окраски вносит пептидная связь.

Метод не применим к тканевым экстрактам, так как многие соединения небелковой природы дают синее окрашивание с реактивом Фолина, прежде всего фенольные вещества. Кроме того, реакции мешает содержание в реакционной среде следующих веществ: сахарозы (более 10 мМ), триса (более 0,1 мМ), глицерина (более 1 мМ), стрептомицина и пенициллина (более 0,3 мкг/мл), многих солей. Соли калия (более 12 мМ) вызывают выпадение осадка. Предложены модификации метода, позволяющие нейтрализовать действие мешающих веществ. Например, добавление в реакционную смесь додецилсульфата натрия (ДДС) снижает влияние на реакцию тритона X-100 и дезоксихолата. Если примесь действует только на фон, то такое влияние можно учесть, включив это вещество в контрольную пробу. Если вещество влияет на развитие окраски с белком, то следует включить его и в растворы белка-стандарта, используемые для калибровки. Реакцию можно проводить в присутствии глицерина (до 10%), этанола (5%), ТХУ или хлорной кислоты (5 мг/мл). Обычно перед тем, как определить белок, его осаждают из тканевого экстракта, осадок промывают и растворяют в щелочи. Это позволяет освободиться от фенолов, липидов, компонентов буфера, мешающих определению.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр, центрифуга.

Реактив Фолина: 100 г вольфрамата натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 г молибдата натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 700 мл дистиллированной воды, добавляют 50 мл 85%-ной фосфорной кислоты и 100 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19). Смесь кипятят в течение 10 ч в круглодонной колбе на 2 л с обратным холодильником. После этого добавляют 150 г сернокислого лития Li_2SO_4 , 50 мл воды и несколько капель брома (Br_2). Кипятят смесь еще 15 мин без холодильника для удаления избытка брома. После охлаждения объем раствора доводят водой до 1 л и фильтруют его. Реактив Фолина ярко-желтого цвета хранят в посуде из темного стекла и перед употреблением разбавляют в 2 раза (до однонормальной концентрации кислоты, что можно проверить титрованием щелочью с добавлением фенолфталеина).

Реактив А: 2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 н. NaOH .

Реактив В: 0,5%-ный раствор медного купороса ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в 1%-ном растворе цитрата натрия или калий-натрия $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Реактив С: к 50 мл реактива А приливают 1 мл реактива В. Смесь готовят перед анализом.

20%- и 2%-ная ТХУ, 96%-ный этанол, этанол/диэтиловый эфир (1/1), диэтиловый эфир, 1 н. NaOH .

Ход работы. Белок из тканевого экстракта или мембранного препарата осаждают равным объемом 20%-ной ТХУ, промывают осадок 2%-ной ТХУ, затем этанолом, этанол/эфиром, эфиром. Осадок каждый раз отделяют центрифугированием. Подсушенный на воздухе осадок растворяют в течение 1–2 ч в 1 н. NaOH и затем разбавляют в 10 и более раз водой.

К 1 мл белкового раствора (10–100 мкг/мл) приливают 2 мл реактива С. Через 10 мин приливают 0,2 мл 1 н. реактива Фолина. Через 30–40 мин фотометрируют раствор при 750 нм на спектрофотометре или с красным светофильтром на ФЭКе против контрольной пробы, не содержащей белка. Поскольку зависимость интенсивности окраски от количества белка нелинейна, следует пользоваться калибровочной кривой, построенной по белку-стандарту, например, по бычьему сывороточному альбумину.

Отношение объемов реактива С и реактива Фолина всегда должно быть 10:1, а объем белковой пробы можно уменьшать. Например, к 0,5 мл пробы прилить 2,5 мл реактива С и 0,25 мл реактива Фолина. Белковая проба должна быть слабощелоч-

ной, так как оптимальная окраска развивается в реакционной смеси при pH 10–10,5 (среда забуферена 2%-ным Na_2CO_3 реактива С).

4.1.2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА БЕЛКА ПО СОРБЦИИ КРАСИТЕЛЯ (МЕТОД ВРЕДФОРД)

Метод основан на специфической сорбции белками в кислой среде красителя кумасси бриллиант ярко-синего G-250. Сорбция происходит в результате гидрофобных взаимодействий, а также связывания красителя с сульфгидрильными и аминокруппами белков. Метод обладает высокой специфичностью. Реакцию дают только полипептиды с молекулярной массой выше 3000. Определению не мешает содержание в реакционной смеси сахарозы (до 10 мМ), этанола (2%), ацетона (до 0,5%), фенола (до 0,01%), триса (до 10 мМ), хлоридов (100 мМ), ЭДТА (до 2 мМ), этиленгликоль-бис(β -аминоэтиловый эфир)- N,N' -тетраацетата (ЭГТА, до 2 мМ), цитрата Na (до 5 мМ), пирогосфата Na (до 5 мМ), ацетата Na (до 5 мМ), стрептомицинсульфата (до 1%), дитиотреитола (до 50 мМ), глицерина (до 1%), сульфата аммония (20 мМ). Белок можно определить в присутствии свободных аминокислот (до 50 мкМ), а также нуклеотидов, РНК, ДНК, если их содержание в препарате не превышает более чем в 10–20 раз количество белка. Метод не может быть использован для белковых проб, содержащих свыше 0,01% детергентов тритона X-100 и ДДС. Белок нельзя определять этим методом в побуревших экстрактах тканей, где много фенолов и фенолаз, поскольку сорбция полифенолов на белках препятствуют связыванию кумасси с белком. Недостатком метода является адсорбция красителя на стенках стеклянной и кварцевой кювет, но в одной серии измерений это составляет ошибку не более 1%. После опыта кюветы отмывают от красителя в течение нескольких минут в 0,1–0,5%-ном растворе ДДС или в течение нескольких часов в 0,1 М HCl.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр.

Белковый реагент: 100 мг кумасси бриллиант ярко-синего G-250 растворяют в 50 мл 96%-ного этанола. К этому раствору добавляют 100 мл 85%-ной фосфорной кислоты и доводят его объем водой до 1 л. Раствор фильтруют и хранят не менее двух недель при комнатной температуре.

Ход работы. К 1 мл раствора, содержащего 3–30 мкг белка,

pH 3–10, прилить 2 мл белкового реагента. В результате сорбции красителя на белке исходная коричневая окраска кумасси в кислоте (максимум поглощения 465 нм) переходит в синюю (максимум поглощения 595 нм). Реакция завершается через 2–3 мин при 20–30°C. Окраска стабильна в течение 1 ч. Отношение проба:реагент можно варьировать от 0,02 до 0,5 без существенного изменения результатов, например, можно к 3 мл реагента прилить 0,1 мл белковой пробы. Измерения проводят против соответствующего контроля в кювете толщиной 1 см. Если значения коэффициентов экстинкции реакционной смеси лежат в пределах 0,050–0,600, то концентрацию белка (мкг/мл) в пробе можно определить по формуле:

$$C_{\text{белка}} = \frac{E_{595} \cdot V_{\text{реакционной среды}}}{0,060 \cdot V_{\text{белковой пробы}}}$$

При значениях коэффициентов экстинкции за пределами указанного диапазона нет прямой пропорциональности между содержанием белка и интенсивностью синей окраски. В этом случае используют калибровочную кривую, построенную по бычьему сывороточному альбумину ($E_{280\text{нм}}^{1\text{мг/мл}} = 0,660$).

4.1.3. Электрофорез белков

Зональный электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) является очень эффективным методом фракционирования белков. Он позволяет оценить состав белковых смесей, выявить множественные молекулярные формы ферментов. Разработаны сотни методик определения ферментативных активностей белков в ПААГ. Для разделения белков грубого экстракта из растительной ткани чаще всего используют диск-электрофорез в щелочной буферной системе в нативных условиях, по Дэвису, и в денатурирующих условиях в присутствии ДДС, по Лэммли.

4.1.3.1. НАТИВНЫЙ ШЕЛОЧНОЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Растительные белки в основном кислые, поэтому в слабощелочном буфере они имеют отрицательный заряд (диссоциированы кислотные группы) и движутся по направлению к аноду. Скорость движения в электрическом поле сквозь сетку геля определяется плотностью заряда на молекулу белка и ее разме-

рами. В этом процессе многие белки сохраняют ферментативные активности.

Оборудование и реактивы. Прибор для электрофореза в трубках или на пластинках, центрифуга.

Растворы для гелей: 1) 1 н. HCl — 48,0 мл, трис — 36,6 г, тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) — 0,23 мл в 100 мл водного раствора, pH 8,9; 2) 30 г акриламида, 0,8 г N, N' -метиленбисакриламида в 100 мл водного раствора, профильтровать; 3) 1,4 мг/мл персульфата аммония; 4) 6,4 мл 1 М H_3PO_4 , 1,43 г трис, 0,02 мл ТЕМЕД в 25 мл раствора, pH 6,9; 5) 2,5 г акриламида, 0,63 г N, N' -метиленбисакриламида в 25 мл водного раствора; 6) 40 мг/л рибофлавина. Все растворы, кроме (3), можно хранить в холодильнике несколько месяцев, раствор (3) — не более недели. Для приготовления гелей используют нагретые до комнатной температуры растворы.

Разделяющий гель (7,5%): сливают вместе 1 часть раствора (1), 2 части раствора (2), 1 часть H_2O , 4 части раствора (3). Гель образуется в течение получаса. Концентрирующий гель: сливают вместе 1 часть раствора (4), 2 части раствора (5), 1 часть раствора (6), 4 части H_2O . Гель (2,5%) формируется за 15–30 мин в зависимости от интенсивности синих лучей солнца, или люминесцентной лампы.

Электродный буфер: 6 г трис, 28,8 г глицина в 1 л водного раствора (pH 8,3), перед употреблением разбавляют в 10 раз, используют однократно.

0,001%-ный раствор бромфенолового синего, 40%-ная сахароза, 1%-ный раствор кумасси R-250 в этаноле (перед употреблением разбавляют в 20 раз 12%-ной ТХУ).

Ход работы. Белки из растительной ткани экстрагируют подходящим буфером. Его состав мало влияет на результаты разделения белков, определяемые составом буферов в ПААГ и электродных сосудах. Для более четкого разделения белков экстракт очищают от низкомолекулярных примесей пропусканием через колонку с сефадексом Г-25 (для 1–1,5 мл экстракта можно использовать шприц объемом 5 мл). Элюируют белок с колонки электродным буфером или тем буфером, который использовался для экстракции. Эта процедура необходима, если исходный экстракт имеет высокую ионную силу. Затем белковый экстракт уплотняют глицерином или сахарозой, доводя их концентрацию в растворе до 10–20%, и добавляют 1 каплю раствора бромфенолового синего на 1–2 мл экстракта. На 1 см^2

поверхности геля наносят 0,1–2 мг белка в растворе. Высота столбика раствора обычно составляет 0,1–0,5 см, в предельном случае — до 2 см. В течение 15–45 мин проводят концентрирование белков при 100–200 В, 3–6 мА/см². За это время белки проходят концентрирующий гель и собираются на старте разделяющего геля. Разделение белков ведут при 300–400 В, 10–15 мА/см² в течение 1,5–2 ч, пока полоса лидирующего красителя не приблизится к нижней границе геля. Гели выталкивают из трубок или отделяют от стеклянных пластинок и погружают в 0,05%-ный раствор кумасси R-250 в 12%-ной ТХУ на ночь. Избыток красителя удаляют в течение дня двумя-тремя сменами 12%-ной ТХУ.

4.1.3.2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ С ДДС ПО ЛЭММЛИ

Этот метод позволяет оценить количество полипептидов в белковой смеси, им достигается очень четкое разделение белков. Однако активность ферментов в основном утрачивается, так как происходит денатурация белков. Разделение белков идет по их размерам, т.е. по молекулярной массе, и не зависит от заряда белков. Это связано с тем, что ДДС⁺ сорбируется на белках пропорционально их объему, плотность заряда у разных белков становится одинаковой и разная скорость их движения в электрическом поле определяется только различием в трении о сетку геля. Поэтому данным методом можно определить молекулярную массу белка, используя белки-стандарты с известной молекулярной массой. Белки в щелочном растворе с ДДС заряжены отрицательно и движутся к аноду.

Оборудование и реактивы. Прибор для электрофореза в трубках или на пластинках, центрифуга, электроплитка, водяная баня.

Электродный буфер: 6 г трис, 28,8 г глицина, 2 г ДДС, 1,169 г ЭДТА в 2 л водного раствора, рН 8,3. Буфер для проб: 0,756 г трис, 1 г ДДС, 10 мл глицерина, 5 мл 2-меркаптоэтанола, 1 мг бромфенолового синего, 58 мг ЭДТА, концентрированная HCl до рН 6,8 в 100 мл раствора.

Растворы для гелей: 1) 30 г акриламида, 0,8 г *N*, *N'*-метиленабисакриламида в 100 мл водного раствора, 2) 280 мг персульфата аммония в 100 мл водного раствора, 3) 18,16 г трис, 0,4 г ДДС, 0,234 г ЭДТА, концентрированная HCl до рН 8,8 (примерно 2,7 мл) в 100 мл водного раствора, 4) 6,04 г трис, 0,4 г ДДС, 0,234 г ЭДТА, концентрированная HCl до рН 6,8 (при-

мерно 4,6 мл) в 100 мл раствора ТЕМЕД. Все растворы, кроме раствора (2), можно хранить несколько месяцев в холодильнике, раствор (2) — готовить еженедельно.

Разделяющий гель (15% акриламида, 0,375 М трис-буфера, 0,1% ДДС): 2 части раствора (1), 1 часть раствора (2), 1 часть раствора (3), 0,0012 части ТЕМЕД. Полимеризуется за 30–40 мин при комнатной температуре (сливают нагретые до комнатной температуры растворы). Концентрирующий гель (5% акриламида, 0,125 М трис-буфера, 0,1% ДДС): 2 части раствора (1), 3 части раствора (2), 3 части раствора (4), 4 части воды, 0,0072 части ТЕМЕД. Полимеризуется за 30–40 мин при комнатной температуре.

50%-ный этанол, 0,1%-ный раствор кумасси R-250 в 50%-ном этаноле и 7%-ной уксусной кислоте, 7%-ная уксусная кислота в 25%-ном этаноле.

Ход работы. Экстракцию белков из гомогената ткани можно проводить буфером для проб, затем взвесь центрифугируют 15 мин при 10 тыс. *g*, супернатант 1–2 мин кипятят на водяной бане. Если белки экстрагированы иным буфером, то их перед нанесением на гель разбавляют в 2–3 раза в зависимости от кислотности и молярности буфера буфером для проб и кипятят. Если экстракт является крепким буфером, сильно отличающимся по кислотности и составу от буфера для проб, или содержит много солей, то его следует пропустить через колонку с сефадексом Г-25, элюировать трис-буфером (см. 4.1.3.1.), а затем разбавить вдвое буфером для проб и прокипятить. На 1 см² поверхности геля наносят 0,1–2 мг белка в растворе. Высота столбика раствора обычно составляет 0,1–0,5 см. До тех пор пока белки не войдут в гель, электрофорез ведут при 50 В. Напряжение 100 В поддерживают, пока белки не достигнут разделяющего геля. Разделение белков ведут при 200 В в течение 2 ч и заканчивают, когда полоса лидирующего красителя приблизится к концу геля. Гели выталкивают из трубок или отделяют от стеклянных пластинок и промывают тремя сменами 50%-ного этанола в течение 10 мин. Затем погружают на ночь в раствор кумасси. Избыток красителя удаляют за 1–2 дня несколькими сменами 7%-ной уксусной кислоты в 25%-ном этаноле. Белки в ДДС-гелях можно быстро окрасить, если промыть их несколько минут водой, погрузить на 10 мин в 0,3 М CuCl₂, затем снова промыть водой. При этом гель становится мутным, светло-голубым, а белковые полосы остаются прозрачными.

4.1.3.3. ДВУМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

При разделении сложных смесей белков гомогената растений белковые полосы могут перекрываться на электрофореграммах. Например, в проростках кукурузы содержатся сотни разных белков, но при разделении нативным электрофорезом они образуют только 21 зону. С помощью электрофореза с ДЛС выявляют до 50 белковых полос. Увеличить разрешающую способность метода можно с помощью электрофореза во втором, поперечном направлении. Первоначально белки фракционируют изоэлектрическим фокусированием или нативным электрофорезом. Разделение белков во втором направлении обычно проводят по Лэммли.

Оборудование и реактивы. См. 4.1.3.1. и 4.1.3.2.

Ход работы. Белки фракционируют в пластинках геля толщиной не более 1 мм (см. 4.1.3.1). Гели, не окрашивая, разрезают на вертикальные полоски по ширине карманов концентрирующего геля и переносят в 50%-ный этанол. В этаноле гели можно хранить. За 1 ч до постановки электрофореза во втором направлении полоски геля помещают в буфер концентрирующего геля для ДЛС-электрофореза (см. 4.1.3.2, раствор 4 для гелей). Затем полоски укладывают по длине на пластину концентрирующего геля (см. 4.1.3.2), проводят электрофорез белков, по Лэммли, и окрашивают белки (см. 4.1.3.2). Толщина пластины геля для фракционирования во втором направлении должна быть несколько больше, чем для фракционирования в первом.

4.1.4. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ

Для разделения белков часто используют целлюлозоанионы: слабый катионит карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) и слабый анионит диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭЦ). Задержание белков на катионите происходит в слабокислом буфере, на анионите — в слабощелочном. Элюция белков с ионитов обычно достигается промыванием ионообменной колонки буфером со ступенчатым или непрерывным возрастанием концентрации нейтральных солей (KCl, NaCl), иногда изменяют и pH элюата. Приведем пример хроматографического разделения белков на ДЭАЭЦ.

Оборудование и реактивы. Две хроматографические колонки с рабочим объемом 12–13 мл, причем соотношение длины и диаметра колонки может варьировать от 20 до 4 (можно использовать шприц объемом 10 мл), магнитная мешалка, пери-

стальтический насос (можно обойтись без насоса, если сосуды с элюатом укрепить над колонкой), коллектор фракций, центрифуга, химическая посуда.

ДЭАЭШ емкостью 0,6–0,8 мэкв/г (Реанал), тонкий сефадекс Г-25 (Реанал); 1 л 10 мМ трис-НСl буфера, рН 8,1, из них 200 мл — для приготовления 0,8 М раствора NaCl.

Приготовление обессоливающей колонки: около 2 г сефадекса суспендируют в воде, кипятят 5–10 мин, заполняют суспензией колонку (см. 2.3). Колонку промывают трис-НСl буфером до тех пор, пока кислотность вытекающей из колонки жидкости не станет постоянной (рН 8,1).

Приготовление ионообменной колонки: около 2 г ДЭАЭШ суспендируют в 50 мл 1%-ной NaOH и многократно промывают декантацией, добавляя новые порции щелочи (всего 200–300 мл), затем колонку многократно промывают водой и заполняют суспензией (см. 2.3). Колонку продолжают промывать водой до нейтральной реакции элюата, затем промывают буфером (250–300 мл), пока значение рН вытекающей из колонки жидкости не установится на уровне 8,1.

Ход работы. Растительный материал на холоду экстрагируют 10 мМ трис-НСl или буфером (2–5 мл буфера/г растительной ткани), сразу центрифугируют 15–20 мин при 10–20 тыс. g. До 4 мл центрифугата наносят на колонку с сефадексом и элюируют белок с колонки трис-буфером. При этом белковый раствор освобождается от низкомолекулярных примесей, пигментов и происходит смена буфера, если для экстракции белков из тканей использовался иной буфер. Затем белковый раствор пропускают через ионообменную колонку (количество белка для колонки объемом 12–13 мл составляет 5–20 мг, причем объем раствора белка может значительно варьировать, но его концентрация не должна превышать 5 мг/мл). Колонку промывают буфером для удаления не сорбируемых в данных условиях белков до тех пор, пока в элюате не останется белка. Затем начинают элюцию белка с колонки раствором NaCl с линейным градиентом концентрации (0–0,8 М) в 10 мМ трис-НСl буфера, рН 8,1. В смеситель вносят 150 мл буфера, а в питающий сосуд — 150 мл 0,8 М NaCl в буфере. Скорость элюции 1–1,5 мл/мин, время разделения около 4 ч. Элюат собирают фракциями по 3 мл. По окончании фракционирования колонку промывают 1%-ной NaOH, водой, трис-буфером до постоянного значения рН и вновь используют для разделения белков.

4.1.5. Анализ свободных и входящих в белки аминокислот.

Выделение и фракционирование аминокислот распределительной хроматографией на бумаге

В тканях растений насчитывается до 150 различных аминокислот, 22 из них входят в состав белков и называются протеиногенными. Содержание свободных аминокислот зависит от вида растения, ткани, органа, условий выращивания, стадии развития. Аминокислоты могут быть экстрагированы водными растворами, этанолом. Для очистки экстракта от солей, пигментов, сахаров, органических кислот используют ионообменники. Аминокислотный состав белков, изолированных тем или иным способом, определяют после их кислотного гидролиза. Аминокислоты фракционируют с помощью ионообменной колоночной хроматографии, которая автоматически осуществляется в аминокислотных анализаторах, или распределительной хроматографии на бумаге (пример приведен ниже).

Оборудование и реактивы. Камера для нисходящей распределительной хроматографии на бумаге, хроматографическая бумага "средняя", пробирки на 40 мл со шлифом и обратным холодильником, фарфоровые чашки и ступка, водяная баня, пульверизатор, спектрофотометр или фотоэлектроколориметр.

96%- и 80%-ный этанол; в качестве растворителя смесь н-бутанол: концентрированная уксусная кислота: вода (4:1:5, используется верхняя фаза); 10%-ный изопропанол.

Приготовление пропитателя: 100 мг уксуснокислого кадмия, 10 мл воды, 5 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл ацетона, 1 г перекристаллизованного нингидрина (25 г нингидрина растворяют в 125 мл горячей 2 н. HCl, добавляют 2–5 г активированного угля, кипятят 10 мин и фильтруют горячим через бумажный фильтр; при охлаждении раствора 4 ч при комнатной температуре и 16 ч в холодильнике выпадают кристаллы нингидрина, их промывают на стеклянном фильтре 2 н. холодной HCl и сушат в эксикаторе над P₂O₅). Приготовление ионообменной колонки: 1,5 г измельченного и просеянного сквозь двойное сито (см. 2,3) катионита КУ-2 с размером частиц 0,2–0,5 мм промывают на стеклянном фильтре 4 н. HCl до вытекания бледно-желтой жидкости, многократно промывают водой, суспендируют в воде и вливают в колонку размером 0,5 · 10 см, снова промывают 4 н. HCl до обесцвечивания элюата и водой до установления pH 6,0.

Ход работы. 5–10 г вегетативных органов растений залива-

ют 10 мл горячего 96%-ного этанола и кипятят 2–3 мин на водяной бане (из семян злаков, содержащих спирторастворимые белки, аминокислоты экстрагируют водой, а белки, оказавшиеся в экстракте, осаждают хлороформом). Экстракт сливают в фарфоровую чашку, погруженную в водяную баню (40–50°C), которая установлена в вытяжном шкафу, и выпаривают спирт при 40–50°C. Можно использовать вакуум-испаритель. Фиксированную ткань растирают в ступке, заливают 20 мл 80%-ного горячего этилового спирта и экстрагируют аминокислоты 30 мин при 70–80°C на водяной бане в пробирках с обратным холодильником. Экстракт осторожно, стараясь не взмутить осадок, сливают в фарфоровую чашку, из которой выпаривается жидкость. Экстракцию выполняют еще 3 раза. Сгущенный экстракт разбавляют до 10 мл горячей водой, через 30 мин осадок отделяют центрифугированием. Слабокислый или нейтральный экстракт пропускают через колонку КУ-2, колонку промывают 20–30 мл воды для полного удаления органических кислот и сахаров. Затем аминокислоты элюируют с колонки 10 мл 4 н. HCl. Раствор аминокислот упаривают в водяной бане в вытяжном шкафу для удаления избытка HCl, растворяют в 2 мл воды или в 10%-ном изопропанолe и используют для хроматографии. Для изучения аминокислотного состава белков 5–6 мг белка гидролизуют с 2 мл 6 н. HCl в запаянных ампулах при 100°C в течение 24 ч. Гидролизат разбавляют водой и отфильтровывают от нерастворимых гуминов, кислоту удаляют, упаривая гидролизат в 4–5 раз на водяной бане. Остаток растворяют в 4 мл воды и используют для хроматографии.

На ленты (12–60 см) хроматографической бумаги марки "средняя" наносят по 40–50 мкл опытного раствора, растворов индивидуальных аминокислот для идентификации пятен или стандартного раствора, содержащего по 0,001 М каждой аминокислоты, для количественного определения аминокислот. Разделение ведут в нисходящей системе трехкратным пропусканием растворителя н-бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:5). После каждого пропускания бумагу подсушивают.

Хроматограммы после третьего разделения подсушивают и протягивают через проявитель или опрыскивают им. Затем снова подсушивают на воздухе и для максимального развития окраски на 16–18 ч помещают в темную камеру над концентрированной серной кислотой. Окрашенные пятна нарезают, заливают 4 мл этанола и оставляют в темноте на 1 ч, периодически

ски помешивая. Оптическую плотность этанольного экстракта измеряют при 540 нм против элюата неокрашенного участка хроматограммы. Количество аминокислоты определяют по отношению оптических плотностей экстрактов пятен данной аминокислоты, полученных разделением исследуемого раствора и стандартного раствора аминокислот. Чем ближе эти величины, тем точнее определение. Аминокислоты располагаются на хроматограмме в следующей последовательности (от старта), примерно соответствующей порядку возрастания гидрофобности: цистеин и цистин, глютамин, лизин, аргинин и гистидин, аспарагиновая кислота, глицин и серин, глютаминовая кислота и оксипролин, треонин, аланин, пролин, тирозин, триптофан, метионин, валин, фенилаланин, изолейцин, лейцин.

4.2. КУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты — высокомолекулярные полинуклеотиды. Нуклеотиды, из которых построены ДНК, состоят из 2-дезоксирибозы, фосфата, пуринового или пиримидинового азотистого основания. РНК состоит из эквимоларных количеств рибозы, фосфата, азотистых оснований. Более 70% ДНК клетки находится в ядре в составе хроматина, построенного на 40% из ДНК и на 60% из белков. Кроме того, ДНК содержится в хлоропластах (до 5–6% всей ДНК клетки) и в митохондриях (до 20% всей ДНК клетки). 80–90% РНК — это рибосомальные РНК (рРНК). Около 10% РНК приходится на низкомолекулярные растворимые транспортные РНК (тРНК), 3–5% — на матричные, или информационные РНК (мРНК, или иРНК). В тканях растений содержится 0,1–1% ДНК в расчете на сухую массу. Молодые, особенно меристематические, ткани растений содержат больше ДНК, чем старые, дифференцированные. Содержание РНК в клетках растений в 5–10 раз выше, чем ДНК, и составляет 1–5% сухой массы ткани. Высокие значения отношения РНК/ДНК свидетельствуют об интенсивном белковом синтезе в клетке.

Молекулярная масса ДНК составляет десятки–сотни млн, мРНК — 0,5–4 млн, рРНК — 0,7–1,8 млн, тРНК — 23–30 тыс. Поэтому нуклеиновые кислоты образуют вязкие растворы. Нуклеиновые кислоты имеют высокую плотность — около 1,7 г/см³. Благодаря большим размерам и плотности они при высокоскоростной седиментации проходят плотные слои сахарозных градиентов. Нуклеиновые кислоты осаждаются в этаноле, ацетоне,

хлороформе, разбавленных кислотах, растворяются в щелочах и солевых растворах. РНК легко гидролизует в теплых растворах щелочей (0,3–0,5 н.). ДНК и РНК гидролизуют при нагревании в следующих концентрированных кислотах: 98%-ная муравьиная кислота (30 мин, 175°C), 12 н. HClO_4 (1 ч, 100°C), 6 н. HCl (2 ч, 120°C).

4.2.1. Извлечение нуклеиновых кислот из тканей растений

Методы определения нуклеиновых кислот основаны на применении специфических реакций на рибозу, дезоксирибозу и фосфорную кислоту или на измерении специфического поглощения нуклеиновых кислот в ультрафиолете благодаря азотистым основаниям. Следует удалить из анализируемого материала вещества, мешающие определению нуклеиновых кислот, такие как: свободные нуклеотиды, нуклеозиды, азотистые основания, фенольные соединения, пигменты, липиды, белки, углеводы, фосфаты. Низкое содержание нуклеиновых кислот в тканях растений и множество мешающих определению веществ вызывают большие сложности выделения и анализа РНК и ДНК растительных объектов (по сравнению с тканями животных). Определение нуклеиновых кислот можно разделить на три этапа: очистка растительного материала от мешающих веществ; экстракция и гидролиз нуклеиновых кислот; количественное определение нуклеиновых кислот по фосфору, азотистым основаниям или пентозам.

Растительный материал промывают органическими растворителями и охлажденными разбавленными кислотами (TXU или HClO_4), в которых нуклеиновые кислоты не растворяются. Существуют десятки вариантов промывки растительного материала перед извлечением нуклеиновых кислот, разработанные применительно к разным объектам в зависимости от содержания в них пигментов, липидов, фенольных веществ. Эти способы включают экстракцию ткани холодным и горячим метанолом, этанолом, ацетоном, эфиром, их смесями, с добавлением 0,01–0,05 н. минеральных кислот, аскорбиновой кислоты, хлористого натрия. Кислотные экстракции ткани более однотипны и, как правило, состоят из 2–4 промывок в 0,2–0,5 н. холодной HClO_4 или TXU . Способ промывки следует индивидуально подбирать к исследуемому объекту. В хорошо промытом материале гидролизаты РНК и ДНК должны иметь $E_{260/230}$ и $E_{260/280}$ больше

единицы. После промывки нуклеиновые кислоты в сумме могут быть извлечены горячим 0,5 н. раствором ТХУ или хлорной кислоты. РНК легче растворяется в этих кислотах, чем ДНК, поэтому нуклеиновые кислоты можно экстрагировать избирательно. Инкубация в течение 18 ч при 4°C в 1 н. HClO_4 приводит к экстракции РНК, а последующее 20-минутное нагревание при 70°C в 0,5 н. HClO_4 вызывает экстракцию ДНК. Можно разделить РНК и ДНК избирательным гидролизом по Шмидту-Таннгаузеру. Нуклеиновые кислоты экстрагируют щелочью, при этом РНК гидролизует. Поэтому при подкислении экстракта в осадок выпадает только ДНК. Этот способ экстракции и разделения нуклеиновых кислот наиболее надежен при работе с растительными объектами. Извлечение и разделение нуклеиновых кислот холодной и горячей кислотами в ряде случаев мало эффективны.

Щелочную экстракцию нуклеиновых кислот и гидролиз РНК проводят в 0,3–0,5 н. КОН (иногда NaOH) в течение 1–2 ч или 16–20 ч при 30–70°C. Специальное исследование показало, что нуклеиновые кислоты практически полностью извлекаются из растительной ткани за 1–2 ч, в дальнейшем из осадка растворяются в основном белки и гемицеллюлозы, которые будут мешать определению нуклеиновых кислот. ДНК, осажденную подкислением щелочного экстракта, гидролизуют в 0,5 н. HClO_4 при 70–90°C за 15–30 мин. Более продолжительное нагревание при высокой температуре приводит к частичному гидролизу белков.

4.2.1.1. МОДИФИКАЦИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО ШМИДТУ-ТАННГАУЗЕРУ

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр, центрифуга, электроплитка, водяная баня, пробирки, пипетки.

96%-ный этанол, диэтиловый эфир, этанол/диэтиловый эфир (1/1 и 3/1), 57%-ная HClO_4 , 0,5 и 0,2 н. HClO_4 , 40%-ная и 0,5 н. КОН, бумажный pH-индикатор.

Ход работы. 1 г колеоптилей кукурузы растирают в жидком азоте и экстрагируют 10 мл холодной смеси этанол/эфир (3/1) в течение 10 мин. Центрифугируют на холоду 10 мин при 3 тыс. g. Промывку повторяют. Осадок промывают три раза холодной 0,2 н. HClO_4 (по 5 мл), 10 мин настаивают на холоду, центрифугируют и отбрасывают центрифугат. Осадок промывают 5 мл холодного этанола, затем нагревают 30 мин при 50°C на водяной бане с 5 мл смеси этанол/эфир (1/1), промыв-

вают осадок 5 мл эфира и подсушивают на воздухе. Осадок заливают 5 мл 0,5 н. КОН и оставляют на 2 ч при 37°C для гидролиза РНК. Осадок отделяют центрифугированием, промывают 1 мл 0,5 н. КОН и отбрасывают. Объединенные супернатанты охлаждают до 4°C и осаждают из них ДНК и белок, прибавляя по каплям охлажденный раствор 57%-ной HClO_4 до конечной концентрации HClO_4 0,2 н. (рН 1). Оставляют смесь на 20–30 мин на холоду для формирования осадка, который затем отделяют центрифугированием на холоду и промывают 1 мл холодной 0,2 н. HClO_4 . Объединенные супернатанты нейтрализуют несколькими каплями 40%-ной КОН до установления рН 8. Выпавший осадок KClO_4 отделяют центрифугированием и промывают 1 мл воды. Объединенные супернатанты используют для определения РНК (чаще всего по поглощению в ультрафиолете).

ДНК из осадка гидролизуют 2 раза 0,5 н. HClO_4 (по 2 мл) нагреванием в течение 15 мин при 70°C, осадок промывают 1 мл 0,5 н. HClO_4 . Объединенные супернатанты используют для определения содержания ДНК (чаще всего по реакции с дифениламином).

4.2.1.2. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ФЕНОЛЬНОЙ ДЕПРОТЕИНИЗАЦИИ

Один из самых распространенных способов выделения нативных нуклеиновых кислот состоит в их экстракции и депротеинизации в смеси водной и фенольной фаз, предложенной К. Кирби (1956). Связь белка с РНК менее прочная, чем с ДНК, поэтому отделение РНК от белков может быть достигнуто при использовании смеси воды или слабого буферного раствора с фенолом. Для выделения ДНК в водную фазу вводят ДДС (0,5–1%), параминаосульфат натрия (4–5%) или 1 М хлористый натрий.

Оборудование и реактивы. Центрифуга с охлаждением, рН-метр, песочная баня, колба для перегонки фенола из термостойкого стекла на 250–500 мл, термометр на 200°C, качалка, химическая посуда.

Водонасыщенный фенол, содержащий 0,1% 8-оксихинолина (фенол перегоняют нагреванием на песочной бане при 200°C в аппарате из стекла, смешивают с дистиллированной водой в отношении 8:2, растворяют 0,1 г 8-оксихинолина в 100 мл фенола; раствор стабилен в течение трех суток); 10 мМ трис-НСI буфера, рН 7,8 (0,7 мл 0,01 М HCl , 121 мг трис и 1 г ДДС растворяют

в 100 мл водного раствора, хранится в течение двух недель на холоду); 96%-ный этанол; 2 М ацетатный буфер, pH 5,3 (1,92 мл ледяной уксусной кислоты и 21,76 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл водного раствора); хлороформ.

Ход работы. 1 г ткани растирают в жидком азоте и переносят с помощью 5 мл холодного трис-буфера с 1%-ным ДДС в колбу на 50 мл с 5 мл водонасыщенного фенола, содержащего 0,1% 8-оксихинолина. Встряхивают на холоду на качалке 20 мин, добавляют 1 мл хлороформа и встряхивают еще 20 мин. Фазы разделяют центрифугированием на холоду при 4–6 тыс. g. в течение 5 мин. Верхнюю водную фазу отсасывают пипеткой с отбитым кончиком (чтобы не повредить молекулы ДНК, диаметр кончика должен быть около 2 мм), переносят в новую колбу, содержащую 5 мл фенола с 0,1% 8-оксихинолина, и повторяют депротеинизацию. Вновь отобранную водную фазу депротеинизируют третий раз. Промежуточную и нижнюю фенольную фазу после каждой депротеинизации промывают 1 мл буфера, отделяют водный слой центрифугированием и присоединяют к основной водной пробе, а промежуточный и фенольный слои отбрасывают. Нуклеиновые кислоты осаждают, добавляя к объединенному водному экстракту 2 объема этанола и 2 М ацетатный буфер (0,1–0,2 мл буфера на 20 мл водно-спиртовой смеси). Выдерживают смесь на холоду (-20°C) в течение 1–2 ч и отделяют осадок центрифугированием. Осадок перерастворяют в 2 мл трис-буфера и еще раз проводят депротеинизацию, как описано выше, промывая фенольный и промежуточный слои буфером после отделения основной водной фазы. Затем нуклеиновые кислоты снова осаждают подкисленным спиртом. Осадок промывают 2–3 раза 96%-ным этанолом (по 3–4 мл) и хранят под спиртом при -20°C .

Препарат содержит РНК, ДНК, полисахариды (в основном крахмал). Он может фракционироваться хроматографией, электрофорезом, ультрацентрифугированием. Если требуется удалить крахмал, то можно проинкубировать водный раствор препарата с β -амилазой (0,2 мг/мл) при 37°C в течение 30–60 мин, затем удалить фермент фенольной депротеинизацией. ДНК и полисахариды можно осадить 2-этоксэтанолом.

4.2.2. Количественное определение нуклеиновых кислот

Методы количественного определения нуклеиновых кислот малоспецифичны, так как основаны на физико-химических свой-

ствах, которые нуклеиновые кислоты разделяют с широким спектром веществ, входящих в состав растений. Поэтому для применения этих методов требуется достаточно высокая степень очистки нуклеиновых кислот от мешающих определению веществ (см. 4.2.1).

4.2.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО ПОГЛОЩЕНИЮ УЛЬТРАФИОЛЕТА

Нуклеиновые кислоты поглощают ультрафиолетовое излучение с максимумом 260 нм благодаря входящим в их состав азотистым основаниям. Для измерения используют гидролизаты нуклеиновых кислот, поскольку у нативных молекул поглощение меньше и оно варьирует в зависимости от конформации молекулы (гипохромный эффект). Можно измерять поглощение гидролизатов нуклеиновых кислот, полученных по методу Шмидта-Таннгаузера (см. 4.2.1.1). В экстракте не должно быть веществ, сильно поглощающих ультрафиолет. Поэтому экстрагированные горячей ТХУ нуклеиновые кислоты не могут быть определены этим методом (ТХУ поглощает ультрафиолет). Должны быть удалены фенольные вещества, пигменты, свободные нуклеотиды, что достигается предварительной (перед гидролизом нуклеиновых кислот) промывкой ткани разбавленными холодными кислотами и липидорастворителями. Метод достаточно точен, если поглощение раствора при 270 нм превышает поглощение при 260 нм не более чем на 15%. В противном случае нужно ввести дополнительные промывки исходного материала.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр, пипетки, пробирки.

0,5 н. HClO_4 .

Ход работы. Поглощение нейтрализованного гидролизата РНК измеряют против воды. Поглощение гидролизата ДНК, полученного нагреванием в 0,5 н. HClO_4 , измеряют против 0,5 н. HClO_4 . Традиционно поглощение в ультрафиолете рассчитывают на 1 мкг/мл нуклеинового фосфора. Для РНК $E_{260\text{нм}}^{1\text{мкг/мл P}} = 0,350$. Для кислотного гидролизата ДНК максимум поглощения сдвинут к 268 нм, $E_{268\text{нм}}^{1\text{мкг/мл P}} = 0,283$. Для пересчета на количество нуклеиновой кислоты нужно количество нуклеинового фосфора умножить на коэффициенты: 10,1 (для ДНК), 10,5 (для РНК), 10,3 (для суммы нуклеиновых кислот). В чистом

препарате нуклеиновых кислот значения отношения E_{260}/E_{230} и E_{260}/E_{280} находятся в пределах 2,1–2,4. Если использовать разность $E_{270} - E_{290}$, то удельное поглощение нуклеиновых кислот примерно одинаковое: $E_{270-290}^{1\text{мкг/мл P}} = 0,190$. Это позволяет измерить суммарное количество нуклеиновых кислот в их смеси. Кроме того, в растворе может содержаться белок, поскольку его поглощение при 270 и 290 нм примерно одинаково и оно взаимно вычитается. Содержание нуклеиновых кислот (мкг/мл) вычисляют по формулам:

$$C_{\text{РНК}} = \frac{(E_{270} - E_{290}) \cdot 10,5}{0,190},$$

$$C_{\text{ДНК}} = \frac{(E_{270} - E_{290}) \cdot 10,1}{0,190},$$

$$C_{\text{НК}} = \frac{(E_{270} - E_{290}) \cdot 10,3}{0,190}.$$

4.2.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПО СОДЕРЖАНИЮ ФОСФОРА

Содержание фосфора в нуклеиновых кислотах — величина довольно устойчивая и в среднем для ДНК составляет 9,9%, для РНК — 9,5%, для смеси нуклеиновых кислот — 9,7%. Это позволяет определять количество нуклеиновых кислот по содержанию фосфора. Раствор нуклеиновых кислот сжигают в смеси серной и хлорной кислот, и количество освобождающейся ортофосфорной кислоты измеряют в реакции образования молибденовой сини. При взаимодействии фосфорной кислоты с молибдатом аммония в сернокислой среде образуется фосфорномолибденовая кислота, которая восстанавливается до окрашенных в синий цвет комплексов с помощью восстановителя (амидол, эйконоген, хлористое олово, аскорбиновая кислота, FeSO_4).

Оборудование и реактивы. Фотоэлектрокolorиметр, песчаная баня, электроплитка, термостойкие пробирки на 20–40 мл высотой 15–20 см, стеклянный фильтр, воронка Бюхнера, мерные колбы на 50 и 1000 мл, мерные пробирки на 10 мл, пипетки.

Концентрированная и 10%-ная H_2SO_4 (х.ч.), 10%-ная NaOH , 1%-ный фенолфталеин в этаноле.

Раствор эйконогена (1-амино-2-нафтол-4-сульфоновой кислоты): в мерной колбе на 50 мл последовательно растворяют в воде 7,5 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0,25 г Na_2SO_3 , затем при нагревании на водяной

бане 0,125 г очищенного эйконогена, объем раствора доводят водой до метки и фильтруют его. Раствор не должен иметь щелочной реакции. В закрытой посуде из темного стекла может храниться на холоду две недели. Эйконоген очищают следующим образом: растворяют 1,5 г эйконогена в 100 мл горячего (90°C) 15%-ного раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, содержащего 1 г Na_2SO_3 , охлаждают и фильтруют на воронке Бюхнера. К фильтрату приливают 1 мл концентрированной HCl . Выпавший осадок отделяют фильтрованием через стеклянный фильтр №3, осадок на фильтре промывают 30 мл воды, 15 мл 50%-, 30%- и 96%-ного этанола. Досушивают в эксикаторе в темноте и хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой.

Раствор амидола: 5 г $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (или $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) растворяют в 25–30 мл воды, добавляют 100 мг амидола, объем доводят водой до 50 мл, фильтруют раствор. Хранят две недели в темной склянке на холоду.

2,5% молибденовокислого аммония в 5 н. H_2SO_4 , хранят в темной посуде несколько месяцев на холоду. 439 мг KH_2PO_4 растворяют в 1 л воды, содержащей 20 мл 0,1 н. H_2SO_4 , перед употреблением разбавляют в 4 раза.

Ход работы. 5–6 мл экстракта, содержащего 0,1–2 мг нуклеиновых кислот, вносят в термостойкие пробирки, добавляют 0,5 мл концентрированной H_2SO_4 и 0,2 мл 57%-ной HClO_4 (если ее нет в экстракте). Смесь кипятят сначала на водяной бане для удаления избытка воды, затем на песчаной бане или в металлическом нагревательном блоке при 160–170°C. При более сильном нагреве, особенно на стадии образования белых паров, может происходить потеря фосфора. Приблизительно через 2 ч, когда жидкость из темно-коричневой станет бесцветной, приливают 2–3 мл воды и нагревают смесь еще 10–15 мин. К охлажденным пробам приливают 5–8 мл воды, переносят смесь в мерные пробирки и доводят ее объем водой до 10 мл.

Для определения количества фосфора в мерные пробирки на 10 мл вносят 2–5 мл пробы, добавляют 1–2 капли раствора фенолфталеина и нейтрализуют 10%-ной щелочью до появления розового окрашивания. Розовую окраску убирают 10%-ной H_2SO_4 .

При использовании в качестве восстановителя амидола к пробе приливают 1,6 мл раствора молибдата аммония, добавляют воду до 8–9 мл, приливают 0,5 мл раствора амидола, добавляют воду до 10 мл и перемешивают.

Если в реакции используется эйконоген, то к пробе приливают 1,2 мл раствора молибдата аммония, добавляют воду до 8–9 мл, приливают 0,4 мл раствора эйконогена, добавляют воду до 10 мл и перемешивают.

Через 30 мин пробы колориметрируют против соответствующего контроля на ФЭКе с красным светофильтром в кюветах толщиной 5 или 10 мм. Количество фосфора определяют по калибровочной кривой, построенной с помощью стандартного раствора KN_2PO_4 . На определение берут или от 0,2 до 2 мл стандартного раствора, если используется кювета толщиной 10 мм, или от 0,4 до 4 мл раствора, если используется кювета толщиной 5 мм. Количество РНК в пробе получают умножением количества фосфора на 10,5, ДНК — на 10,1, смеси нуклеиновых кислот — на 10,3.

4.2.2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК С ПОМОЩЬЮ ДИФЕНИЛАМИНА

Это самая распространенная цветная реакция на ДНК. Она основана на специфическом взаимодействии дифениламина в уксусной кислоте с остатками дезоксирибозы молекулы ДНК. С дифениламином реагируют прежде всего пуриновые нуклеотиды, при этом освобождается фосфат. По первоначальной методике, предложенной А. Лише, проба прогревается 10 мин при 100°C с 1%-ным раствором дифениламина в ледяной уксусной кислоте, содержащей серную кислоту (2,75 мл концентрированной H_2SO_4 приливают к 100 мл уксусной кислоты). Предложено несколько модификаций этой методики. Например, при более длительном нагревании (4 ч) с дифениламиновым реактивом реагируют и РНК, причем окрашенный продукт реакции имеет спектр поглощения (максимум при 650 нм), отличный от спектра продукта реакции с ДНК (максимум при 605 нм). Это позволяет определять ДНК и РНК в одной пробе. Введение ацетальдегида и хлорной кислоты в реакционную среду, а также проведение реакции при температуре $25 - 30^\circ\text{C}$ в течение длительного времени (16–20 ч) позволили увеличить в несколько раз чувствительность метода и уменьшить влияние посторонних веществ. Наибольшее применение нашли модификация К. Бартона (1956) и модификация К. Джилеса и А. Майерса (1965).

Для анализа используют раствор ДНК в хлорной кислоте, полученный по методу Шмидта-Таннгаузера (см. 4.2.1.1). Можно извлекать ДНК прямо из промытого липидорастворителями

и холодными разбавленными кислотами материала. Для этого промытый осадок нагревают 15–20 мин при 70–80°C в 0,5–1 н. HClO_4 . При этом в раствор также перейдет и РНК, но она не мешает определению. Можно экстрагировать нуклеиновые кислоты из промытой ткани горячей 5%-ной ТХУ, но после охлаждения следует обязательно вводить в пробу HClO_4 до конечной концентрации 0,5 М. Определению ДНК не мешает содержание в реакционной среде глюкозы, сахарозы, крахмала, уоновых кислот, небольшого количества белков. Развитие окраски с ДНК подавляется высокими концентрациями белка, NaCl (20 мг), аскорбиновой кислотой (0,4 мг), солянокислым цистеином (2 мг).

Модификация Бартона

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр, термостат, водяная баня, электроплитка, пипетки, пробирки.

1,5 г дифениламина растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и приливают 1,5 мл концентрированной H_2SO_4 (плотность 1,84). Дифениламин предварительно перекристаллизовывают в 70%-ном этаноле. Реактив хранится в холодильнике не менее 4 месяцев в темной склянке. 1 мл ацетальдегида растворяют в 50 мл воды, раствор хранится в холодильнике несколько месяцев. Стандартный раствор ДНК для построения калибровочной кривой готовят растворением 1 мг ДНК тимуса теленка или спермы лосося в 10 мл 0,5 н. HClO_4 в течение 15 мин при 70°C. 0,5 н. HClO_4 .

Ход работы. К 20 мл раствора дифениламина перед определением добавляют 0,1 мл раствора ацетальдегида. 2 мл полученного реагента приливают к 2 мл раствора ДНК (5–80 мкг/мл) в 0,25–0,65 М HClO_4 и оставляют на 16–20 ч при 25–35°C. Измеряют оптическую плотность при 600 нм против контрольной пробы. Количество ДНК определяют по калибровочной кривой, построенной со стандартным раствором ДНК, разбавленным в 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 раз. Точное количество ДНК в стандартном растворе определяют по поглощению в ультрафиолете (см. 4.2.2.1).

Модификация Джилеса и Майерса

Метод вдвое чувствительнее модификации Бартона и отличается от нее тем, что ацетальдегид вносят прямо в реакционную

смесь. Кроме того, в дифениламиновом реактиве нет серной кислоты, что позволяет повысить концентрацию дифениламина до 4% и тем самым увеличить чувствительность метода. В присутствии серной кислоты дифениламин при концентрации выше 3% выпадает в осадок в виде дифениламинсульфата.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр, термостат, водяная баня, электроплитка, пипетки, пробирки.

4 г дифениламина растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты; 0,2 мл ацетальдегида прибавляют к 98 мл воды.

1 н. HClO_4 .

Ход работы. К 2 мл раствора ДНК (2–40 мкг/мл) в 1 н. HClO_4 приливают 2 мл 4%-ного дифениламина в ледяной уксусной кислоте и 0,1 мл раствора ацетальдегида. Инкубируют 15–18 ч при 30°C. Измеряют оптическую плотность при 595 нм против соответствующего контроля. Если среда содержит посторонние вещества, она может быть мутной. Чтобы свести фоновое поглощение к нулю, измеряют разность экстинкций при 595 и 700 нм. Пользуются калибровочной кривой, построенной со стандартным раствором ДНК в 1 н. HClO_4 .

4.2.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА РНК ПО РЕАКЦИИ С ОРЦИНОМ

Орцин в соляной кислоте при нагревании взаимодействует с рибозой гидролизата РНК и образует окрашенный в зеленый цвет продукт с максимумом поглощения при 650–660 нм. Орцин взаимодействует и с другими пентозами (например, с 2-дезоксирибозой, метилпентозой), с гексуроновыми кислотами, но чувствительность реагента к этим соединениям на порядок ниже. Ходу реакции мешают полисахариды, белки, липиды, карбонаты, фосфаты, ТХУ. Поэтому для определений следует использовать препараты РНК хорошо очищенные, особенно от свободных сахаров.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр, электроплитка, водяная баня, пипетки, пробирки.

6%-ный раствор орцина в 96%-ном этаноле (готовят в день применения); 0,05%-ный раствор $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в концентрированной HCl ; 100 мкг/мл *d*-рибозы в 0,5 н. HClO_4 .

Стандартный раствор РНК: 1 мг дрожжевой РНК растворяют в 1 мл 1 н. NaOH , через 1–2 ч гидролизат РНК нейтрализуют концентрированной HClO_4 и разбавляют 0,5 н. HClO_4 до

концентрации 0,4 мг/мл. Точную концентрацию РНК в растворе определяют после десятикратного разбавления аликвоты по поглощению в ультрафиолете (см. 4.2.2.1).

Ход работы. К 1 мл гидролизата РНК (20–400 мкг/мл) приливают 1 мл раствора FeCl_3 и 0,1 мл раствора орцина. Нагревают смесь 20 мин в кипящей бане, охлаждают 1–2 мин в ледяной бане. Приливают 0,9 мл 96%-ного этанола для стабилизации зеленой окраски раствора. Колориметрируют раствор при 650 нм против контрольной пробы. Количество РНК определяют по калибровочной кривой, построенной с *d*-рибозой (5–100 мкг/мл) или с дрожжевой РНК (20–400 мкг/мл). Если пользуются калибровочной кривой по *d*-рибозе, то для определения количества РНК нужно умножить количество рибозы на коэффициент 4,4.

4.2.3. Электрофорез нуклеиновых кислот

С помощью электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле можно РНК и фрагменты ДНК разделять на фракции. Удобно использовать препараты нуклеиновых кислот, полученные фенольной депротенинизацией. В нейтральных и слабощелочных водных растворах нуклеиновые кислоты имеют отрицательный заряд (в результате диссоциации фосфатных групп). Поэтому в электрическом поле они движутся по направлению к аноду. Скорость движения зависит, как при любом электрофорезе на нейтральных носителях, от плотности заряда молекулы и от ее размеров. Нуклеиновые кислоты имеют приблизительно одинаковую плотность заряда, поэтому электрофоретическое разделение определяется молекулярной массой молекул и фактически является молекулярной фильтрацией через поры геля. Для электрофореза используют полиакриламидный гель с концентрацией от 2 до 10% в зависимости от величины фракционируемых нуклеиновых кислот. Рибосомальные РНК делят в 2–3%-ных гелях, транспортные — в 7–10%-ных гелях. Иногда используют гели со ступенчатым градиентом концентрации. Можно применять агарозный и агарозно-полиакриламидный гель. Приведем пример электрофореза нуклеиновых кислот в полиакриламидном геле по У.Ленингу (1967).

Оборудование и реактивы. Прибор для электрофореза в трубках. Угольные электроды лучше заменить платиновыми из проволоки или пластинок толщиной 0,2–0,3 мм. Стеклянные трубки для гелей следует заменить плексиглазовыми, так как применяемые для разделения нуклеиновых кислот рыхлые гели

прилипают к стеклу и с трудом извлекаются. Центрифуга, рН-метр.

10%-ный акриламид и 0,5%-ный *N, N'*-метиленбисакриламид (10 г акриламида, 0,5 г *N, N'*-метиленбисакриламида в 100 мл водного раствора). Раствор стабилен несколько месяцев на холоду.

Основной электрофоретический буфер (рН 7,8): 4,4 г трис, 4,68 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,372 г ЭДТА-2Na, 1 г ДДС в одном литре водного раствора, хранят две недели на холоду.

20%-ная сахароза в основном буфере плюс 1–2 капли (на 10 мл раствора) 1%-ного водного раствора бромфенолового синего, ТЕМЕД, 10%-ный персульфат аммония, 7%-ная уксусная кислота, 0,2%-ный метиленовый синий в 0,2 М ацетатном буфере, рН 4,7 (200 мг метиленового синего, 2,72 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,96 мл ледяной уксусной кислоты в 100 мл водного раствора).

Если нуклеиновые кислоты после электрофореза выявляются измерением поглощения при 260–280 нм, то следует дополнительно перекристаллизовывать акриламид и *N, N'*-метиленбисакриламид. 70 г акриламида растворяют в 1 л хлороформа при 50°C, горячий раствор фильтруют, остужают до –20°C, выпавшие кристаллы промывают холодным хлороформом и высушивают. *N, N'*-метиленбисакриламид растворяют в ацетоне (10 г в 1 л) при 40–50°C, горячий раствор фильтруют, остужают до –20°C, выпавшие кристаллы промывают холодным ацетоном и высушивают.

Ход работы. Для приготовления 40 мл 2,5%-ного геля смешивают 29,56 мл основного буфера, 10 мл раствора мономеров, 0,04 мл ТЕМЕД, 0,4 мл персульфата аммония (все растворы должны иметь комнатную температуру). Чтобы предотвратить сползание рыхлых гелей, трубки для гелей закрывают снизу целлофаном, который закрепляют с помощью надетого на трубку резинового кольца. Гелеобразующую смесь быстро заливают в трубки (по 2 мл), сверху осторожно наглаивают воду для формирования ровной поверхности геля. Полимеризация заканчивается через 30–40 мин при комнатной температуре. Трубки устанавливают в приборе, заливают в электродные камеры основной буфер и проводят в течение 40 мин преэлектрофорез при плотности тока 10 мА на трубку для удаления катализаторов полимеризации. Затем снижают плотность тока до 2 мА/трубка и вносят на поверхность гелей под слой буфера по 0,04–0,1 мл препарата нуклеиновых кислот (1 мг/мл), раство-

ренного в основном буфере, который содержит 20% сахарозы. Через 15 мин увеличивают плотность тока до 5–6 мА/трубка. Электрофорез прекращают, когда полоса лидирующего красителя приблизится к концу геля (2–3 ч). Гели выдувают из трубок в пробирки с помощью резиновой груши, надевая ее на трубку геля, 20–30 мин промывают водой и денситометрируют при 260–280 нм. Для окрашивания гели вымачивают 10–20 мин в 7%-ной уксусной кислоте, заливают на ночь красителем, избыток которого затем многократно в течение одного–двух дней отмывают водой.

4.2.4. Хроматография нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты и нуклеопротеины можно фракционировать на кизельгуровых колонках с метилированным альбумином (МАК-хроматография). В основе разделения лежит электростатическое связывание нуклеиновых кислот (благодаря диссоциированным фосфатным группам) с метилированным альбумином, основность которого повышена этерификацией карбоксильных групп белка в кислой среде. Таким образом, это разновидность ионообменной хроматографии на слабом анионите. Способ связывания с матрицей мягкий и не приводит к деградации нуклеиновых кислот. Прочность связывания зависит от молекулярной массы нуклеиновых кислот, их нуклеотидного состава, числа водородных связей между азотистыми основаниями. Последовательная элюция фракций нуклеиновых кислот с колонки достигается возрастающей концентрацией хлористого натрия в забуференной среде, рН 6,7–7,4. Транспортные РНК выходят в 0,4 М растворе NaCl, ДНК — в 0,6 М растворе, рибосомальные и информационные РНК — в 0,75–0,85 М растворе. Для разделения удобно использовать препараты нуклеиновых кислот, полученные методом фенольной депротеинизации (см. 4.2.1.2).

Оборудование и реактивы. Хроматографическая колонка диаметром 1,2–1,5 см, высотой 12–15 см (соотношение диаметра и высоты колонки может варьировать, что мало сказывается на результатах разделения), впаянная в стеклянную муфту с двумя отводами для циркулирования воды из термостата; водяной и суховоздушный термостаты; перистальтический насос; магнитная мешалка; два химических стакана на 200 мл; силиконовые трубки; автоматический коллектор фракций; эксикатор.

Метилированный альбумин готовят следующим образом:

0,5 г бычьего сывороточного альбумина суспендируют в 50 мл абсолютного метанола, приливают 0,42 мл 12 н. HCl и оставляют на трое суток в термостате при 25 — 30°C, периодически помешивая. При этом белок растворяется, а затем вновь выпадает в осадок. Осадок метилированного альбумина отделяют центрифугированием, дважды промывают метанолом и дважды — диэтиловым эфиром. Затем высушивают в эксикаторе над КОН, растирают в порошок и хранят в стеклянном бюксе на холоду в течение нескольких месяцев. Кизельгур марки "Нуфю Supercel" (10 г) обычно промывают последовательно 100 мл 1 н. NaOH, 50 мл воды, 50 мл 1 н. HCl, водой до нейтральной реакции и высушивают в сушильном шкафу.

0,1 М, 0,2 М и 1,2 М NaCl в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 6,7 (1,4625 г или 2,925 г, или 17,550 г NaCl плюс 1,050 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 0,911 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ в 250 мл водного раствора).

Ход работы. Для заполнения колонки 5 г кизельгура суспендируют в 25 мл 0,1 М NaCl в 50 мМ фосфатном буфере, pH 6,7, кипятят в течение нескольких минут для удаления пузырьков воздуха из пор носителя, охлаждают раствор и осторожно вливают, помешивая, 1,1 — 1,2 мл 1%-ного водного раствора метилированного альбумина, добавляют еще 6 мл солевого раствора и оставляют в холодильнике на один час. Вливают суспензию в колонку, в которую предварительно налито 5 — 10 мл солевого раствора. Спускают лишний раствор, оставив только небольшой слой жидкости над поверхностью кизельгура. Заполненную МАК колонку промывают 50 мл 0,1 М забуференнй соли, затем 50 мл 0,2 М забуференнй соли для удаления избытка метилированного альбумина. 2 — 4 мг нуклеиновых кислот растворяют в 20 — 40 мл 0,2 М NaCl в натрий-фосфатном буфере и пропускают через колонку со скоростью 2 — 4 мл/мин. Затем промывают 20 мл того же раствора. Элюцию проводят раствором NaCl с нарастающей концентрацией в фосфатном буфере. Для этого используют одно из приспособлений для создания линейного градиента концентрации (см. 2.3), включающее два сообщающихся сосуда, магнитную мешалку, перистальтический насос. В сосуд-смеситель наливают 150 мл 0,2 М NaCl в фосфатном буфере, в резервуар — 150 мл 1,2 М забуференного раствора NaCl. Элюцию проводят при 35°C со скоростью около 1 мл/мин в течение 5 ч. Разделение при комнатной температуре менее четкое. Фракции элюата собирают в пробирки по 3 мл с по-

мощью коллектора фракций. Содержание нуклеиновых кислот определяют спектрофотометрически по поглощению ультрафиолета (260 нм). С помощью рефрактометра можно определить концентрацию NaCl во фракциях нуклеиновых кислот.

4.2.5. Анализ нуклеотидов

Нуклеотиды состоят из азотистого основания (пуринового или пиримидинового), пентозы (рибозы или дезоксирибозы), фосфатных групп. В свободном состоянии в клетке находятся рибонуклеотиды, а дезоксирибонуклеотиды — только в следовых количествах. В наибольших количествах содержатся АТФ, АДФ, УДФ-сахара, УДФ, АМФ, в наименьших — гуанидиновые и цитидиновые нуклеотиды, а также динуклеотиды НАД и НАДФ. В сумме содержание нуклеотидов в растениях составляет 100–1000 мкМ в 1 кг сырой массы (0,005–0,05%). В молодых тканях нуклеотидов больше, чем в старых. Обычно нуклеотиды выделяют с помощью 5–10%-ных растворов ТХУ или хлорной кислоты. Для очистки от примесей нуклеотиды сорбируют активированными углями, но элюировать с угля удается только 40–60% нуклеотидов. Ход фракционирования с использованием ионообменной хроматографии на анионитах Дауэкс 1·8, 1·10 приведен ниже. Индивидуальные компоненты в хроматографических фракциях идентифицируют с помощью распределительной хроматографии на бумаге.

Оборудование и реактивы. Хроматографическая колонка 1·10 см, коллектор фракций, холодная камера, центрифуга с охлаждением, магнитная мешалка, два сообщающиеся цилиндрические сосуда на 300 мл (см. 2.3), спектрофотометр.

10%-ная HClO_4 , 4 н. KOH , 1 н. HCOOH , 4 н. HCOOH , 0,2 М HCOONH_4 в 4 н. HCOOH , 0,4 М HCOONH_4 в 4 н. HCOOH , 0,8 М HCOONH_4 в 4 н. HCOOH , 25%-ный раствор аммиака.

Приготовление ионообменной колонки: 2 г Дауэкс 1·8 или 1·10 (200–400 МЕШ) суспендируют в воде и заполняют колонку. Промывают колонку 50 мл 2 н. HCl , затем водой до нейтральной реакции. После этого промывают 2 М HCOONa в 2 н. HCOOH до отрицательной реакции на Cl^- (с AgNO_3) в элюате. Затем промывают 20 мл 85%-ной HCOOH и дистиллированной водой до нейтральной реакции. Для регенерации использованную колонку обрабатывают 2 н. NaOH , промывают водой, 2 н. HCl , снова водой. Верхний потемневший слой заменяют новым. Затем заряжают в формиатную форму, как описано выше.

Ход работы. 10–20 г фиксированной жидким азотом или лиофилизированной ткани 10 мин экстрагируют на холоду 20 мл 10%-ной HClO_4 , перемешивая суспензию с помощью магнитной мешалки. Экстракт отделяют центрифугированием 10 мин при 10 тыс. *g*. Осадок еще раз экстрагируют 10%-ной HClO_4 . Объединенные экстракты подщелачивают холодной 4 н. КОН до pH 7. Выпавший осадок отделяют центрифугированием. Центрифугат пропускают через ионообменную колонку, установленную в холодной камере. Затем колонку промывают водой до тех пор, пока оптическая плотность раствора при 260 нм не станет ниже 0,050.

Таблица 4.2. Поглощение ультрафиолетового света нуклеотидами при pH 1,0

Нуклеотиды	Оптическая плотность 1 мМ раствора при 260 нм (слой 1 см)	Длина волны (нм), при которой оптическая плотность		Отношение оптических плотностей при разных длинах волн	
		максимальная	минимальная	$E_{250}/260$	$E_{270}/260$
Аденозин-фосфаты	14,5	257–258	230	0,84	0,71
Гуанозин-фосфаты	10,8	256	228	0,93	0,73
Уридин-фосфаты	10,0	261–262	230	0,76	0,87
Цитидин-фосфаты	6,3	280	241	0,47	1,71

Элюцию нуклеотидов проводят в экспоненциальном градиенте в формиатной системе. В смеситель наливают 150 мл воды. В резервуар, установленный над смесителем, наливают 300 мл 1 н. HCOOH . Скорость вытекания жидкости из смесителя на колонку должна быть уравновешена со скоростью втекания жидкости в смеситель из резервуара и со скоростью элюции (она составляет около 0,6 мл/мин). Когда резервуар опустеет, в смесителе по-прежнему остается 150 мл жидкости. Элюцию продолжают, последовательно наливая в резервуар по 300 мл следу-

ющих растворов: 4 н. HCOOH , 0,2 М HCOONH_4 в 4 н. HCOOH , 0,4 М HCOONH_4 в 4 н. HCOOH , 0,8 М HCOONH_4 в 4 н. HCOOH . Элюаты собирают фракциями по 5 мл и определяют их оптическую плотность при 260 нм. Разделение продолжается около двух суток. Нуклеотиды выходят из колонки в следующей последовательности: ЦМФ, АМФ, ГМФ, ЦДФ, АДФ, УМФ, АДФ, ГДФ, УДФ, ЦТФ, АТФ, ГТФ, УТФ. Могут обнаруживаться пики динуклеотидов, УДФ-сахаров, других производных нуклеотидов. В первом приближении пики могут быть идентифицированы по положению на хроматограмме. Кроме того, можно снять спектры поглощения в диапазоне 220–310 нм и идентифицировать аденозиновые, гуанозиновые, цитидиновые и уридиновые нуклеотиды по форме кривой поглощения ультрафиолета, положению на ней минимумов и максимумов, отношению оптических плотностей $E_{230/260}$, $E_{270/260}$, $E_{280/260}$ (табл. 4.2). Поскольку ультрафиолетовое поглощение существенно зависит от рН раствора, требуется подвести рН к 1,0 (или другой величине) с помощью 25%-ного аммиачного раствора, не забывая при этом учесть изменение объема проб.

Более точную идентификацию нуклеотидов можно осуществить посредством дальнейшего хроматографического разделения фракций, например, нисходящей бумажной хроматографией в системе растворителей этанол:1 М ацетат аммония, рН 7,5 (75:30, по объему).

4.3. УГЛЕВОДЫ

Углеводы — это альдегидо- и кетоспирты, у которых не менее двух гидроксильных групп. Углеводы, не гидролизующиеся с образованием других углеводов, называются моносахаридами. Углеводы, способные гидролизоваться, называются олигосахаридами или полисахаридами. В составе олигосахаридов 2–10 моносахаридных остатков. Полисахариды — высокомолекулярные углеводы с молекулярной массой от нескольких тысяч до сотен миллионов.

Моносахариды делят на нейтральные, содержащие только гидроксильные и карбонильную группы, аминсахара, включающие еще и аминогруппу, и кислые сахара, имеющие в своем составе карбоксильную группу (уроновые, альдоновые, альдаровые кислоты).

Полисахариды высших растений представлены крахмалом, целлюлозой, гемицеллюлозами, пектиновыми веществами. Кра-

хмал — основной запасной полисахарид. Это гомополимер, построенный из остатков D-глюкозы, связанных 1-4- α -гликозидной связью. Его молекулярная масса находится в пределах от сотен тысяч до сотен миллионов. Целлюлоза (клетчатка) — линейный гомополимер, построенный из остатков D-глюкозы, связанных 1-4- β -гликозидной связью. Молекулярная масса целлюлозы составляет от 200 тыс. до 2 млн. Это основной компонент клеточных стенок растений. Пектиновые вещества построены в основном из остатков галактуроновой кислоты. В состав пектинов входит некоторое количество рамнозы, других нейтральных сахаров. Молекулярная масса пектиновых веществ в среднем составляет 25–35 тыс. Термином "гемицеллюлозы" объединены все остальные многочисленные линейные и разветвленные гомо- и гетерополисахариды, построенные из десятков и сотен остатков гексоз и пентоз молекулярной массой в десятки тысяч. Это маннаны и галактаны (гексозаны), арабаны и ксиланы (пентозаны), ксиланоглюканы, арабиногалактаны, арабиноксиланы.

Углеводы — основные органические вещества растений. Их содержание составляет 80–90% сухой массы. Соотношения различных групп углеводов существенно отличаются не только у разных растений, но и в разных частях одного растения. Например, сахаров особенно много в сочных плодах и в корнеплодах (2–10% сырой массы). В одних растениях (виноград) они представлены в основном глюкозой, в других (арбуз, груша) — фруктозой, в третьих (в сахарной свекле 20% сырой массы) — сахарозой. Содержание пектинов может достигать 20% сухой массы (в плодах), но обычно составляет несколько процентов. Крахмала особенно много в семенах зерновых и зернобобовых культур (60–80%), в клубнях картофеля (12–22% сырой массы). Целлюлоза преобладает в волокнах хлопчатника (95–98%) и льна (80–90%), в древесине (40–50%), сене, соломе (20–40%).

Для разделения углеводов используют различия в их растворимости и в гидролизуемости под действием кислот и гликолитических ферментов. Олиго- и моносахариды разделяют различными хроматографическими методами.

4.3.1. Экстракция из растений фракций углеводов

Существует ряд методов выделения и количественного определения одной группы углеводов из растений, обогащенных этими углеводами. Например, очистка картофельного и пшенично-

го крахмала, получение сахарозы из сахарной свеклы, пектинов из жома сахарной свеклы, целлюлозы из хлопковых волосков, пентозанов из соломы. В этих случаях все остальные углеводы представляются примесями, которые должны быть удалены. В систематическом анализе максимально полно учитываются все углеводы. Для их разделения пользуются различиями в растворимости (в условиях гидролиза углеводов разных групп), а также специфическими реакциями с фенольными веществами, фелинговой жидкостью, раствором иода и др.

Полисахариды в отличие от моно-, ди-, трисахаридов не растворяются в спирте. Поэтому по многим схемам анализа отделение моно- и олигосахаридов происходит в результате первоначальной экстракции ткани 80–85%-ным этиловым спиртом. В холодной воде растворяется часть пектиновых веществ и небольшое количество гемицеллюлоз (в плодах до 40% от суммы гемицеллюлоз). Крахмал растворяется и клейстеризуется при нагревании в воде до 60–70°C. Протопектины в основном могут быть извлечены кипячением в 0,5–1%-ных растворах оксалата или цитрата аммония, при этом экстрагируется и ряд гемицеллюлоз. Основная фракция гемицеллюлоз, а также часть крахмала растворяются в 5–10%-ных щелочах. Некоторые гемицеллюлозы и протопектины извлекаются только посредством гидролиза в разбавленных кислотах. Целлюлоза растворяется в концентрированной серной кислоте, хромовой смеси, швейцеровом реактиве (гидроксид меди в аммиаке).

Эффективным способом переведения полисахаридов из ткани в раствор служит их кислотный гидролиз. Так, кипячением в течение 2–3 ч в 1–1,5 н. соляной или серной кислоте можно экстрагировать крахмал, гемицеллюлозы, все пектиновые вещества, часть целлюлозы. При этом крахмал и гемицеллюлозы гидролизуются. Более жесткие условия требуются для гидролиза пектиновых веществ, поэтому они могут быть осаждены спиртом или ацетоном после кислотной экстракции. Целлюлоза гидролизуется в тех же условиях, что и крахмал, и гемицеллюлозы, но только после предварительного растворения в концентрированной серной кислоте. Углеводы из разных растений могут сильно отличаться по растворимости и гидролизуемости не только вследствие различий в составе данного полисахарида, но и в зависимости от того, какие полисахариды ему сопутствуют и в каком количестве. Это следует учитывать даже при выделении сравнительно однородного по составу крахма-

ла. Существенно различаются по растворимости протопектины и особенно гемицеллюлозы. Например, в некоторых плодах до 40% гемицеллюлоз водорастворимы, до 80% протопектина растворяется при кипячении в воде. Различные гемицеллюлозы можно разделить гelfильтрацией и ионообменной хроматографией на колонках; моносахариды, входящие в их состав, а также свободные — с помощью распределительной хроматографии.

Оборудование и реактивы. Электроплитка, водяная баня, центрифуга, центрифужные пробирки, фарфоровые чашки, пробирки на 20 мл со шлифом и обратным воздушным холодильником.

96%- и 82%-ный этанол, петролейный или диэтиловый эфир, 0,1 н. и 4 н. NaOH, 1 н., 2 н. и концентрированная H_2SO_4 , 1%-ный оксалат аммония, 1%-ный раствор β -амилазы, концентрированная уксусная кислота.

Ход работы. 0,5 г измельченных с добавлением мела проростков злаков заливают 5 мл горячего 96%-ного этанола и кипятят на водяной бане 30 мин с обратным холодильником. Экстракт осторожно сливают через бумажный фильтр, стараясь не перенести осадок, в фарфоровую чашку, погруженную в теплую водяную баню (40–50°C) в вытяжном шкафу. Остаток в пробирке заливают 5 мл 82%-ного этанола и экстрагируют при слабом кипении в течение 30 мин. Экстракт вновь сливают через фильтр в чашку, из которой происходит выпаривание спирта. Экстракцию выполняют еще два раза. Сгущенный до 0,2–0,5 мл сироповидный экстракт растворяют в 10 мл воды и встряхивают несколько минут с 5 мл эфира для экстракции хлорофилла и липидов. После разделения слоев отсасывают слой эфира. Отбирают 1 мл водного раствора и разбавляют водой до 25 мл. В этом растворе определяют гексозы по реакции с антроном. Свободные пентозы (их очень мало) определяют по реакции с орцином в неразбавленном водном растворе. Остаток в пробирке подсушивают в вытяжном шкафу на водяной бане при 40–50°C, заливают 5 мл теплой воды и экстрагируют 1 ч при 40–50°C на водяной бане растворимые пектины и очень незначительное количество гемицеллюлоз. Переносят суспензию в центрифужную пробирку и центрифугируют 15–20 мин при 10 тыс. g. Центрифугат сливают в пробирку, а осадок два раза промывают теплой водой (по 5 мл) с последующим центрифугированием. Объем объединенных центрифугатов доводят водой

до 20 мл. К 5 мл водного экстракта приливают 5 мл 0,1 н. NaOH и оставляют на ночь для омыления пектиновых веществ. Затем подкисляют экстракт 1–2 каплями 2 н. серной кислоты, разбавляют вдвое водой и определяют количество водорастворимых пектинов по реакции с карбазолом.

В остатке растительного материала горячей водой растворяют крахмал. Для этого ткань в пробирке суспендируют в 2 мл теплой воды, вливают в пробирку с 2 мл кипящей воды и 5 мин прогревают на водяной бане при 60 – 70°C. После охлаждения раствора до 40°C в него вливают 0,1 мл 1%-ного раствора β -амилазы и оставляют при 37 – 40°C на ночь для гидролиза крахмала до мальтозы. Отделяют экстракт от остатка центрифугированием, остаток два–три раза промывают теплой водой. Объем объединенных центрифугатов доводят водой до 20 мл, затем квоту этого раствора разбавляют еще в 10–15 раз и определяют крахмал по реакции с антроном.

Для извлечения протопектина остаток переносят с 5 мл 1%-ного оксалата в пробирку с обратным холодильником и кипятят 30 мин на водяной бане. Экстракт отделяют центрифугированием, осадок промывают 2 мл оксалата. Объединенные центрифугаты нейтрализуют 0,1 н. NaOH, затем подщелачивают равным объемом 0,1 н. NaOH и оставляют на ночь при комнатной температуре для омыления пектинов. Количество пектинов определяют по реакции с карбазолом после разбавления пробы в два раза. Во фракции протопектина может оказаться некоторое количество гемицеллюлоз, которые можно определить отдельно после кислотного гидролиза.

Основная фракция гемицеллюлоз извлекается из остатка щелочными растворами, чаще всего последовательно 1 н. и 4 н. КОН или NaOH. Остаток переносят в пробирки на 5 мл и заливают 5 мл 4 н. NaOH доверху, плотно закрывают пробкой и оставляют на 2 ч. Экстракт отделяют центрифугированием, осадок промывают 1 мл щелочи. К объединенному центрифугату приливают концентрированную уксусную кислоту до установления pH 4,5 и вливают весь объем раствора при помешивании в 3 объема (примерно 25 мл) 96%-ного этанола. Гемицеллюлозы хлопьями выпадают в осадок. Его отделяют центрифугированием, промывают 96%-ным этанолом, диэтиловым эфиром, подсушивают и гидролизуют кипячением 2 ч в 2 мл 1 н. H_2SO_4 с обратным холодильником на водяной бане. Гидролизат в 100 раз разбавляют водой и определяют в нем гексозы с антроном,

пентозы — с орцином.

Остаток промывают 2 мл этанола, 2 мл эфира, подсушивают на воздухе и заливают 1,2 мл концентрированной H_2SO_4 для растворения целлюлозы. Через 3 ч приливают 18 мл воды и гидролизуют 3 ч на кипящей водяной бане в пробирках с обратным холодильником. Квоту охлажденного гидролизата разбавляют в два-три раза водой и определяют в нем количество глюкозы по реакции с антроном.

4.3.2. Количественное определение углеводов

Альдегидо- и кетогруппы сахаров легко окисляются в щелочной среде. Это свойство используется для количественного определения сахаров в реакции с фелинговой жидкостью (смесь медного купороса с сегнетовой солью в щелочной среде), в результате которой выпадает осадок закиси меди. В настоящее время содержание сахаров значительно чаще определяют с помощью цветных реакций с фенольными веществами (фенол, орцин, резорцин, карбазол и др.) в концентрированных кислотах. Под действием концентрированных кислот сахара образуют циклические альдегиды — фурфуралы, при конденсации которых с фенолами появляются окрашенные продукты. Некоторые из этих методов приведены ниже. Все большее распространение получают энзиматические методы, отличающиеся более высокой специфичностью, чем химические. Например, содержание сахарозы определяют, гидролизуя ее инвертазой, а затем окисляя глюкозооксидазой освободившуюся при гидролизе глюкозу. При этом образуется перекись водорода, которая в присутствии пероксидазы окисляет о-дианизидин с образованием окрашенного продукта.

4.3.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЕКСОЗ ПО РЕАКЦИИ С АНТРОНОМ

Этим методом можно определить свободные гексозы и олигосахара (сахарозу, рафинозу, мальтозу), которые легко гидролизуются в кислой реакционной среде. Крахмал, целлюлозу, гексозы гемицеллюлоз выявляют после предварительного гидролиза. Продукты превращения гексоз в сильнокислой среде (прежде всего оксиметилфурфурол), взаимодействуя с антроном, окрашивают раствор в сине-зеленый цвет с максимумом поглощения при 260 нм. Реакции мешает содержание в среде

большого количества белков. Белки из экстракта можно предварительно осадить, добавив равные объемы 5%-ного ZnSO_4 и 0,3 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ до установления в экстракте pH 8,2.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр, электроплитка, пробирки на 20 мл, пипетки.

Антроновый реактив: 150 мг антрона растворяют при нагревании в 100 мл разбавленной серной кислоты (750 мл концентрированной х.ч. H_2SO_4 , 300 мл воды). Антрон лучше перекристаллизовать из смеси бензола с петролейным эфиром (3:1). Раствор лучше готовить в день употребления, можно хранить в холодильнике в темноте не более недели. 5 н NaOH .

Ход работы. К 0,1–0,5 мл водной пробы (слабокислой, слабощелочной, нейтральной), содержащей 5–50 мкг сахаров, прилить 3 мл антронового реактива. Если реакцию проводить при 25–27°C в течение 1,5–2 ч, то окрашивание дает только фруктоза (свободная или образовавшаяся в результате гидролиза сахарозы, инулина, рафинозы) и в меньшей степени другая кетогексоза – сорбоза. При нагревании реакционной смеси на кипящей водяной бане в течение 15 мин реагируют и другие гексозы: глюкоза, галактоза, манноза, рамноза, фукоза. Реакцию прекращают, погружая пробирки в охлажденную воду или в снег. Измеряют экстинцию при 620 нм против контрольной пробы. Пользуются калибровочной кривой, построенной по глюкозе, фруктозе, сахарозе или иному сахару, который предполагают определять (например, в хроматографической фракции). По удельной экстинкции в этой реакции сахара несколько отличаются друг от друга. 50 мкг сахара в пробе объемом 0,1 мл дают следующую экстинкцию (толщина кюветы 1 см) реакционной среды: фруктоза — 0,61 (0,58 при комнатной температуре), сорбоза — 0,45, глюкоза — 0,60, манноза — 0,31, галактоза — 0,36, рамноза — 0,58, фукоза — 0,58.

В спиртовой вытяжке многих растений основные сахара — это глюкоза, фруктоза и сахароза. Можно определить содержание каждого из них в смеси, пользуясь антроновым методом. Суммарную фруктозу определяют, проводя реакцию при комнатной температуре. Фруктозу сахарозы определяют, разрушив предварительно свободную фруктозу. Для этого к 1 мл водной пробы приливают 0,1 мл 5 н. NaOH и кипятят 10 мин. Затем проводят реакцию с антроном при комнатной температуре. Проведя реакцию при высокой температуре, определяют сумму фруктозы и глюкозы, как исходно свободных, так и образовав-

шихся в результате гидролиза сахарозы. Содержание глюкозы легко вычислить, отняв от полученной суммарной величины вклад в поглощение суммарной фруктозы, а также глюкозы, освободившейся из сахарозы.

Пример расчета. E_1 при высокой температуре = 0,761, E_2 при комнатной температуре = 0,318, E_3 при комнатной температуре (после щелочного гидролиза свободной фруктозы) = 0,222.

E_3 по калибровочной кривой соответствует 34,4 мкг сахарозы в пробе. E_2 по калибровочной кривой соответствует 27,4 мкг суммарной фруктозы. Если от суммарной фруктозы отнять фруктозу сахарозы, получим свободную фруктозу: $34,4 : 2 : 0,9 = 19,1$ (мкг), $27,4 - 19,1 = 8,3$ (мкг свободной фруктозы). По калибровочному графику находим значения коэффициентов экстинкции для 8,3 мкг фруктозы и 34,4 мкг сахарозы при высокой температуре. Эти значения отнимаем от E_1 : $0,761 - 0,101 - 0,462 = 0,198$, что соответствует 16,5 мкг глюкозы в пробе (обычно в 0,1 мл).

4.3.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ПЕНТОЗ ПО РЕАКЦИИ С ОРЦИНОМ (СМ. 4.2.2.4.)

4.3.2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ГЕКСУРОНОВЫХ КИСЛОТ ПО РЕАКЦИИ С КАРБАЗОЛОМ

Карбазольная реакция в серной кислоте — удобный и часто применяемый метод количественного определения гексуроновых кислот. Этот метод требует нагревания углевода в концентрированной (70–80%) серной кислоте до прибавления реагента. При этом происходит гидролиз полиуронидов до урсонных кислот и превращение последних в производные фурфурола. Добавление карбазольного реагента приводит к окрашиванию раствора в розовый цвет с максимумом поглощения при 520 нм.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр, электроплитка, водяная баня, пробирки на 20 мл, пипетки.

Карбазольный реагент: 150 мг перекристаллизованного из толуола карбазола растворяют в 100 мл очищенного этанола. Для получения очищенного этанола кипятят 24 ч с обратным холодильником 1 л этанола с 4 г цинковой пыли и 4 мл 50%-ной H_2SO_4 . Спирт перегоняют. Перегонку повторяют, добавив по 4 г цинковой пыли и КОН на 1 л спирта. Концентрированная

H_2SO_4 (х.ч.), 1 М водный раствор $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 4 М водный раствор сульфамата аммония или калия (можно готовить из сульфаминовой кислоты, растворяя ее в воде добавлением КОН в таблетках). Стандартный раствор для построения калибровочной кривой готовят, растворяя 10 мг моногидрата галактуроновой кислоты в 100 мл 0,1 н. H_2SO_4 (100 мкг/мл).

Ход работы. К 0,8 мл раствора сахаров (5–70 мкг/мл) приливают по 0,1 мл растворов сульфамата и бората. Пробирки с пробами помещают в ледяную баню и приливают 5 мл охлажденной концентрированной H_2SO_4 , перемешивают и через несколько минут переносят на 8–10 мин в кипящую водяную баню. Затем пробирки вновь переносят в ледяную воду и после охлаждения смеси до комнатной температуры добавляют 0,2 мл 0,15%-ного карбазола в этаноле. Вновь переносят пробирки в кипящую воду на 10 мин. Затем охлаждают их в ледяной воде до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность раствора при 520 нм против контрольной пробы, не содержащей сахаров. Количество уроновых кислот вычисляют, пользуясь калибровочной кривой, построенной для галактуроновой кислоты в диапазоне концентраций моногидрата галактуроновой кислоты 5–60 мкг/мл (для пересчета на ангидрокислоту, нужно умножить количество моногидрата на 0,83). Борат и особенно сульфамат увеличивают специфичность реакции к уроновым кислотам, сводя практически к нулю реактивность глюкозы, маннозы, галактозы.

4.3.3. Хроматография сахаров.

Разделение сахаров

распределительной хроматографией на бумаге

Метод обычно используют для более детальной характеристики спирторастворимой (моно-, олигосахариды) и щелочерастворимой (гемицеллюлозы) фракций углеводов. Состав гемицеллюлоз анализируется после кислотного гидролиза (см. 4.3.1.) и осаждения сульфата с помощью 10%-ной $\text{Ba}(\text{OH})_2$ до нейтральной реакции.

Оборудование и реактивы. Камера для нисходящей распределительной хроматографии на бумаге, хроматографическая бумага "быстрая", пульверизатор.

Проявитель: 1 г KMnO_4 , 2 г Na_2CO_3 в 100 мл водного раствора. Растворитель: н-бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:5), встряхивать 10 мин в делительной воронке, использовать верх-

нюю фазу. 1%-ные растворы следующих сахаров: глюкозы, рибозы, рафинозы, сахарозы, мальтозы, лактозы, ксилозы, арабинозы, фруктозы, галактозы.

Ход работы. Исследуемый раствор, содержащий 0,5–1% смеси сахаров, наносят в количестве 20–40 мкл на стартовую линию за несколько приемов, каждый раз подсушивая пятно, диаметр которого должен составлять 5–6 мм. Кроме того, наносят по 10 мкл стандартных растворов сахаров. В одну точку можно вносить раствор только одного сахара либо группы сахаров, максимально различающихся между собой по R_f в данном растворителе. Например, можно объединить рафинозу и глюкозу с рибозой, лактозу и галактозу с ксилозой и т.д. В описанном растворителе сахара имеют следующие R_f .

Рафиноза	— 0,05	Галактоза	— 0,16	Фруктоза	— 0,23
Лактоза	— 0,08	Глюкоза	— 0,18	Ксилоза	— 0,25
Мальтоза	— 0,11	Манноза	— 0,20	Рибоза	— 0,31
Сахароза	— 0,14	Арабиноза	— 0,22		

Разделение проводят трехкратным пропусканием растворителя через хроматографическую бумагу, каждый раз подсушивая хроматограмму. Сахара проявляют, опрыскивая подсушенную бумагу раствором перманганата. Хроматограмму сушат при комнатной температуре. Сахара проявляются в виде желтых пятен на пурпурном фоне, положение пятен сразу следует отметить карандашом. Для количественного определения сахаров в пятнах окрашивают только боковую полосу хроматограммы. Неокрашенные зоны нарезают и экстрагируют водой. Содержание пентоз определяют с орцином, гексоз — с антроном. Калибровку проводят по тому сахару, который находится в зоне.

4.4. ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

Растения отличаются высоким содержанием органических кислот, они имеются во всех органах и тканях. В плодах особенно много органических кислот в свободной форме. В листьях содержатся нейтральные и кислые соли органических кислот. Свободные кислоты имеются в листьях щавеля, ревеня, суккулентов. Растения разных видов существенно отличаются по составу и количеству органических кислот, содержание которых варьирует от долей процента до 40% на сухую массу. Наиболее часто встречаются яблочная, лимонная и шавелевая кислоты.

Органические кислоты — продукты неполного окисления углеводов — образуются главным образом в процессе дыхания (цикл Кребса, глиоксилатный цикл), являются предшественниками аминокислот и жиров. Они обуславливают буферные свойства клеточного сока, участвуют в переносе ионов, могут использоваться как источники энергии.

Содержание органических кислот изменяется с ростом и развитием растения и зависит от минерального питания, температуры, времени суток, степени зрелости плодов. Определение количества и состава органических кислот имеет большое практическое значение для селекционных исследований и совершенствования способов выращивания сельскохозяйственных культур.

4.4.1. Экстракция кислот из растительного материала и определение содержания органических и минеральных, свободных и связанных кислот

Приведенные ниже методы качественного и количественного анализа органических кислот разработаны в нашей стране на кафедре физиологии и биохимии Ленинградского университета проф. С.В. Солдатенковым и Т.А. Мазуровой (1971).

4.4.1.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Органические кислоты можно экстрагировать водой и эфиром из свежих, замороженных и высушенных тканей. Экстракция эфиром длительна, требует предварительного подкисления материала минеральной кислотой для перевода органических кислот из солей в свободное состояние. Достоинством метода является то, что в эфирный экстракт не переходят сахара и минеральные кислоты. Однако некоторые органические кислоты с трудом растворяются в эфире, и их количество оказывается несколько заниженным.

Для определения органических кислот растительный материал фиксируют в сушильном шкафу при 120°C в течение 15 - 20 мин и затем досушивают при 60 - 70°C до постоянного веса. Высушивание при комнатной температуре ведет к потере органических кислот при дыхании.

Здесь рассматривается метод извлечения органических кислот из воздушно-сухой растительной ткани нагретой водой.

Оборудование. Сушильный шкаф, водяная баня, конические колбы, мерные цилиндры.

Ход работы. Сухой растительный материал измельчают при помощи электрической мельницы и просеивают через сито с размером отверстий 0,25 см. 4 г сухой ткани помещают в термостойкую колбу объемом 300 мл и заливают дистиллированной водой, нагретой до 50°C, на 3/4 объема. Соотношение сухого материала и воды при экстракции может составлять от 1:30 до 1:100. При соотношениях 1:30, 1:50 необходима двукратная экстракция, при большом объеме жидкости достаточно экстрагировать материал один раз. Экстракцию проводят в течение 1 ч на водяной бане при 70–80°C, часто помешивая содержимое колбы. Затем его охлаждают, переносят в мерный цилиндр и приливают воду до определенного объема. Экстракт фильтруют через складчатый фильтр, измеряют объем фильтрата. В ходе экстракции из ткани извлекаются водорастворимые вещества, в том числе органические и неорганические кислоты, не извлекается кальциевая соль шавелевой кислоты.

4.4.1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ КИСЛОТ

Содержание кислот определяют титрованием щелочью. Фракцию органических кислот выделяют, получая бариевые соли и осаждая их 60%-ным спиртом. В свободное состояние кислоты переводят с помощью катионообменной смолы.

Оборудование и реактивы. Центрифуга на 5–8 тыс. об/мин, водяная баня, фарфоровые чашки, колбы конические, колбы мерные.

0,1 н. титрованный раствор NaOH, 0,1 н. раствор Ba(OH)₂, 0,1%-ный фенолфталеин, катионообменные смолы КУ-1 или КУ-2. Перед использованием смолу просеивают через два сита с размером отверстий 1 мм и 0,5 мм. Собирают фракцию тех частиц, которые просеиваются через первое сито (размер отверстий 1 мм) и остаются на втором. Частицы крупнее 1 мм растирают в фарфоровой ступке и вновь просеивают. 40 г сухой смолы отмучивают в десятикратном объеме дистиллированной воды до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. Смолу заливают новой порцией воды и оставляют на 3 ч для набухания при периодическом помешивании. Набухшую смолу переносят в колонку Самуэльсона, на дно которой положена стеклянная вата. После наполнения колонки смолу уплотняют стеклянной палочкой. На одну стандартную колонку расходуются около 20 г смолы. Для удаления низкомолекуляр-

ных примесей смолу обрабатывают щелочью. Через колонку пропускают 150–200 мл 5%-ного раствора NaOH со скоростью 1,5–2,5 мл в минуту. Затем катионит отмывают водой до нейтральной реакции и переводят его в H^+ -форму пропусканием 7%-ной соляной кислоты. Обработку кислотой прекращают, когда ее концентрация на выходе из колонки равна исходной. Далее колонку со смолой отмывают дистиллированной водой до нейтральной реакции промывной жидкости. Достаточно пропустить через колонку две порции воды: 200 и 100 мл.

Ход работы. Определяют титруемую кислотность водного экстракта, соответствующую содержанию свободных кислот. Две пробы по 50 мл титруют 0,1 н. NaOH с добавлением нескольких капель 0,1%-ного фенолфталеина до появления розового окрашивания.

Содержание свободных кислот рассчитывают по формулам:

$$C_1 = \frac{0,1 \cdot f \cdot a_1 \cdot V_0}{50}; \quad Q_1 = \frac{f \cdot a_1 \cdot V_0}{50} K; \quad X_1 = \frac{Q_1}{H} \cdot 100,$$

где f — поправка к титру 0,1 н. щелочи; a_1 — объем 0,1 н. NaOH, пошедший на титрование 50 мл экстракта; V_0 — исходный объем экстракта; H — навеска растительного материала (мг); K — пересчетный коэффициент яблочной кислоты — титр 0,1 н. щелочи по яблочной кислоте (он рассчитывается как произведение миллиграмм-эквивалента кислоты на нормальность щелочи и равен 6,7 мг); C_1 , Q_1 , X_1 — содержание свободных кислот, миллиграмм-эквиваленты, расчет на яблочную кислоту (мг), проценты от сухой массы соответственно.

Нейтрализованные пробы объединяют с остальным фильтратом.

Большая часть кислот в тканях растений уравновешена (связана) одно- и двухвалентными катионами. Для получения из солей свободных кислот используют катионообменные смолы КУ-1 или КУ-2. Катионит КУ-2 позволяет удалить из раствора не только катионы, но и аминокислоты. Экстракт пропускают через колонку со смолой в H^+ -форме со скоростью 1,5–2,5 мл/мин. Затем колонку промывают тремя порциями воды по 70 мл. Элюат объединяют с двумя порциями промывных вод. Третью порцию нейтрализуют щелочью, чтобы контролировать полноту выхода кислот. Из экстракта берут две пробы по 50 мл и нейтрализуют 0,1 н. раствором $Ba(OH)_2$ по фенолфталеину. По расчету нейтрализуют остальной объем элюата. Далее раствор нагревают до кипения и проверяют

pH по универсальному бумажному индикатору, если необходимо добавляют барит. В осадок выпадают бариевые соли серной, фосфорной и шавелевой кислот.

Вычисляют *общее содержание кислот* в навеске ткани:

$$C_0 = \frac{0,1f \cdot b_1 \cdot V_0}{V_1}, \quad Q_0 = \frac{f \cdot b_1 \cdot V_0}{V_1} K = \frac{C_0 K}{0,1}, \quad X_0 = \frac{Q_0}{H} 100,$$

где f — поправка к титру 0,1 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$; b_1 — объем 0,1 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, пошедший на титрование элюата; V_0 — исходный объем водного экстракта; V_1 — объем экстракта после фильтрования; C_0 , Q_0 , X_0 — общее содержание кислот, миллиграмм-эквиваленты, пересчет на яблочную кислоту, проценты на сухую массу соответственно.

Содержание кислот, находящиеся в связанном состоянии, т.е. в форме солей, рассчитывают как разницу между общим содержанием кислот и количеством свободных кислот: $C_2 = C_0 - C_1$.

После выпадения в осадок минеральных солей серной и фосфорной кислот определяют содержание органических кислот. Осадок бариевых солей удаляют центрифугированием всего охлажденного раствора в течение 15 мин при 1–2 тыс.г. Измеряют объем центрифугата, содержащий в основном бариевые соли органических кислот. 50 мл центрифугата пропускают через колонку с катионитом в H^+ -форме. Колонку отмывают тремя порциями воды по 70 мл. Объединенный элюат нейтрализуют 0,1 н. баритом и отбрасывают. Рассчитывают количество барита, которое пошло бы на титрование всего объема центрифугата, и определяют *содержание органических кислот* в навеске исследуемого материала по формулам:

$$C_3 = \frac{0,1 \cdot f \cdot b_2 \cdot V_0 \cdot V_2}{50V_1}, \quad Q_3 = \frac{C_3 \cdot K}{0,1}, \quad X_3 = \frac{Q_3}{H} 100,$$

где b_2 — объем 0,1 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, пошедший на титрование 50 мл центрифугата; V_2 — объем центрифугата; C_3 , Q_3 , X_3 — содержание органических кислот, миллиграмм-эквиваленты, миллиграммы яблочной кислоты, проценты на сухую массу соответственно. Остальные обозначения указаны выше. Полученные величины приблизительны, так как не учитывается содержащаяся в растворе азотная кислота.

По разности общего содержания кислот и количества органических кислот определяют *содержание минеральных кислот*: $C_4 = C_0 - C_3$.

Далее бариевые соли органических кислот осаждают этиловым спиртом. Оставшийся центрифугат сгущают выпариванием в фарфоровой чашке на водяной бане до тех пор, пока объем не уменьшится до 25–30 мл. Раствор органических кислот переносят в мерный цилиндр с притертой пробкой, доводят объем раствора до 37 мл водой и добавляют этиловый спирт до 100 мл (конечная концентрация спирта 60%). Раствор тщательно перемешивают и оставляют на ночь. Если на нейтрализацию всего экстракта пошло более 100 мл $\text{Ba}(\text{OH})_2$, то раствор органических кислот сгущают, доводят его объем до 74 мл и добавляют спирт до 200 мл. При этом осаждаются соли ди- и трикарбоновых кислот (на 95–98%). Осадок отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 2–3 тыс. g. В растворе остаются бариевые соли азотной кислоты, полиоксикислот, некоторых других кислот, а также неэлектролиты. Осадок промывают 15 мл 60%-ного этанола и вновь центрифугируют. Промывку проводят дважды. Осадок переносят в колбу Эрленмейера на 500 мл и приливают 250–300 мл горячей воды для растворения осадка. Раствор нагревают до кипения, нерастворившуюся часть осадка отфильтровывают. Охлажденный фильтрат пропускают через колонку с катионитом в H^+ -форме. Колонку промывают тремя порциями воды по 70 мл. Две первые порции присоединяют к элюату, третью нейтрализуют щелочью для проверки полноты выхода кислот. Раствор кислот упаривают под вакуумом или в фарфоровой чашке на водяной бане до тех пор пока объем не уменьшится до 80–90 мл и переносят в мерную колбу на 100 мл. Доводят объем до метки и определяют содержание ди- и трикарбоновых кислот. Отбирают две пробы по 10 мл и титруют 0,1 н. NaOH. Вычисляют *содержание ди- и трикарбоновых кислот* в исходной навеске:

$$C_5 = \frac{0,1 \cdot f \cdot p \cdot a_2 \cdot V_0 \cdot V_2}{V_1(V_2 - 50)}, \quad Q_5 = \frac{C_5 \cdot K}{0,1}, \quad X_5 = \frac{Q_5}{n} \cdot 100,$$

где a_2 — объем 0,1 н. NaOH, пошедший на титрование 10 мл пробы; p — пересчет на весь объем раствора ди- и трикарбоновых кислот (здесь он равен 10); C_5 , Q_5 , X_5 — содержание ди- и трикарбоновых кислот, миллиграмм-эквиваленты, миллиграммы яблочной кислоты, проценты на сухую массу соответственно. Остальные обозначения указаны выше.

По разности содержания органических кислот и количества ди- и трикарбоновых кислот вычисляют *содержание фракции ки-*

слот, бариевые соли которых не осаждаются 60%-ным спиртом:
 $C_6 = C_3 - C_5$.

4.4.2. Разделение органических кислот методами хроматографии на бумаге и в тонком слое

Современные исследования органических кислот выполняются с применением хроматографических методов. Особое значение приобрела распределительная хроматография на бумаге и в тонком слое, позволяющая качественно разделить и надежно идентифицировать разнообразные органические соединения.

4.4.2.1. РАЗДЕЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИ- И ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

Экстракт ди- и трикарбонновых кислот, растворы свидетелей наносят на полосы бумаги и производят разделение в восходящем токе органических растворителей. Хроматограммы проявляют бромфеноловым синим.

Оборудование и реактивы. Тепловентиляторы, хроматоскоп, хроматографические камеры, бумага "Ленинградская М" (медленная) или "Ленинградская С" (средняя), стеклянные капилляры, сушильный и вытяжной шкаф, вакуумный насос (водоструйный).

0,02 н. и 0,05 н. растворы NaOH, 7%-ный раствор HCl. Растворы свидетелей: готовят 0,2 М водные растворы яблочной, лимонной, винной, малоновой, янтарной и фумаровой кислот в объеме 2 мл, а также смесь свидетелей, сливая вместе по 1 мл 0,4 М раствора каждой кислоты.

Бутиловый растворитель: н-бутанол, муравьиная кислота, вода (18:2:9). Компоненты растворителя наливают в делительную воронку, начиная с воды, закрывают притертой пробкой и встряхивают 30 мин. Смесь оставляют на ночь для расслоения, используют верхний слой, содержащий бутанол и муравьиную кислоту.

Эфирный растворитель: диэтиловый эфир, муравьиная кислота, вода (18:5:9). Компоненты вливают в делительную воронку и встряхивают 30 мин, приоткрывая кран воронки, чтобы выпустить пары эфира и выровнять давление. Используют верхний слой, отделяющийся через 1–1,5 ч.

Этиловый растворитель: н-бутанол, этанол, муравьиная кислота (5:1:4). Техника приготовления та же. Растворитель расслаивается через неделю, используется верхний слой.

Ход работы. Стандартные листы хроматографической бумаги разрезают по ходу волокон на полосы шириной 13 см и длиной, соответствующей высоте камеры. На расстоянии 2,5 см от нижнего края простым карандашом проводят стартовую линию. Растворы органических кислот наносят тонким капилляром отдельными пятнами для качественной хроматограммы или сплошной линией пятен шириной около 5 мм для количественной хроматограммы. Нанесение капель выполняют пять раз. На один лист бумаги для количественного анализа расходуют 7–8 мг кислот.

Камерой для хроматографии может служить стеклянный сосуд диаметром не менее 16 см и высотой не более 40 см, снабженный стеклянной крышкой или пришлифованной пластинкой. Могут быть использованы два сосуда высотой 30 см. Верхний служит крышкой нижнего, по линии их соприкосновения наклеивают изоляционную ленту. В нижнем сосуде просверливают отверстие для резиновой пробки, в него вставляют изогнутую толстостенную трубку, на которой подвешивают листы бумаги. На выступающий из камеры конец трубки надевают затвор Бунзена — резиновую трубку с продольным разрезом 0,5 см, закрытую с наружного конца короткой стеклянной палочкой. Хроматограммы подвешивают в камере на горизонтальной части стеклянной трубки так, чтобы они немного не доставали до дна сосуда. Камеры устанавливают в вытяжном шкафу на ночь. Выбор растворителя зависит от состава кислот исследуемого объекта. Яблочная и лимонная кислоты хорошо разделяются в эфирном и этиловом растворителях и не разделяются в бутиловом. В бутиловом растворителе хорошо делятся высокоподвижные кислоты: малоновая, янтарная, аконитовая. Температура в камере не должна превышать 20°C, оптимальная температура — 12–14°C.

Далее хроматограммы проявляют и идентифицируют кислоты с помощью следующих универсальных и специфических растворителей.

1. Неспецифическим проявителем для кислот служит индикатор бромфеноловый синий в концентрации 0,05%. 0,1 г индикатора растирают в фарфоровой ступке с 1,5 мл 0,1 н. NaOH до полного растворения и разбавляют водой до 200 мл. Хромато-

граммы опрыскивают из пульверизатора. Кислоты проявляются в виде желтых пятен на синем фоне. Контуры пятен обводят карандашом и рассчитывают R_f . Перед проявлением хроматограмм следует проверить, полностью ли улетучилась муравьиная кислота. Для этого на бумагу, выше линии фронта наносят каплю бромфенолового синего. Если есть следы кислоты, пятно желтеет.

Непроявленные хроматограммы просматривают в ультрафиолетовом свете на приборе типа "Хроматоскоп". Непредельные кислоты проявляются в виде темных пятен, некоторые алифатические предельные кислоты дают голубое свечение, ароматические — желтое.

2. Опрыскивание хроматограмм 0,5%-ным водным раствором метаванадата аммония NH_4VO_3 (при приготовлении не следует нагревать) позволяет обнаружить ярко-оранжевое пятно винной кислоты на желтом фоне, белое пятно с желтой серединой хинной кислоты, ярко-голубое пятно аскорбиновой кислоты, серое пятно с желтой серединой глюконовой кислоты, ярко-белое пятно фосфорной кислоты, белое пятно лимонной и серо-голубое яблочной кислоты.

3. После опрыскивания хроматограммы 1%-ным водным раствором хлорного железа и высушивания проявляются ярко-белое пятно фосфорной кислоты, розовые пятна янтарной, аконитовой и фумаровой.

4. 4%-ный раствор *n*-диметиламинобензальдегида в уксусном ангидриде используют свеженприготовленным с добавлением кристалла уксуснокислого натрия. После опрыскивания аконитовая кислота дает розово-красное пятно, малоновая — зеленое, яблочная — светло-желтое, винная — красно-оранжевое, лимонная — пурпурно-красное, α -кетоглутаровая — розовато-красное, гиппуровая — оранжевое пятно.

Проведя идентификацию кислот на качественных хроматограммах, приступают к анализу кислот на количественных хроматограммах. Вертикально, на расстоянии 5 мм от краев бумаги капилляром наносят две полосы бромфенолового синего. В зонах нахождения кислот индикатор окрашивается в желтый цвет. Зоны очерчивают карандашом от одного края хроматограммы до другого и идентифицируют их, сопоставляя с качественными хроматограммами. Полоски с индикатором отрезают и выбрасывают. Объединяют зоны одной кислоты с двух хроматограмм, разрезают их на мелкие полоски и переносят в

конические термостойкие колбы на 100 мл. Наливают по 15 мл воды и проводят экстракцию кислот при нагревании на плитке до кипения, помешивая стеклянной палочкой. Содержимое каждой колбы переносят в небольшую бюхнеровскую воронку и фильтруют в специальную пробирку с отводной трубкой, присоединенной к насосу. Элюцию проводят тремя порциями воды по 15 мл. Элюаты объединяют и доводят их объем водой до 50 мл. Элюат делят на две пробы по 25 мл и титруют 0,02 н. NaOH по фенолфталеину. Полнота извлечения кислот из бумаги достигает 98%, погрешность метода 2–5%.

Суммируя объем щелочи, израсходованный на нейтрализацию каждой кислоты, рассчитывают в процентах долю щелочи, приходящуюся на определенную кислоту. Соотношение кислот при хроматографировании не меняется, и, зная объем 0,1 н. щелочи, пошедший на титрование суммарной фракции ди- и трикарбоновых кислот, вычисляют объем 0,1 н. NaOH, приходящийся на каждую кислоту в исходной навеске. Определяют содержание кислот в миллиграммах, умножая соответствующий объем 0,1 н. щелочи на пересчетный коэффициент для каждой кислоты. Количество определенной кислоты может быть рассчитано в миллиграмм-эквивалентах, в процентах на сухой вес, в процентах от суммы ди- и трикарбоновых кислот, от количества органических кислот и от общего содержания кислот.

4.4.2.2. РАЗДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В ТОНКОМ СЛОЕ

Для разделения органических кислот используют пластинки "Силуфол УФ-254" (Чехословакия). Сорбентом служит силикагель, закрепленный на крахмале. Перед использованием пластинки активируют при 150°C 1,5 ч.

Ход работы. На расстоянии 2,5 см от края пластинки мягким карандашом проводят линию старта. Для качественного разделения наносят капилляром пятно (5 капель) раствора смеси кислот свидетелей и пятно исследуемого раствора ди- и трикарбоновых кислот. Для количественного определения наносят сплошной ряд пятен, в каждом по 5 капель раствора кислот. Разделение проводят в растворителе следующего состава: н-бутанол, этанол, муравьиная кислота (5:1:4). Хроматографическая камера с крышкой должна быть предварительно насыщена парами растворителя (его приготовление описано выше). Пластинки помещают в камеру наклонно, погружая в растворитель

на 1–1,5 см, камеру закрывают пришлифованной крышкой. Разделение продолжается 35–50 мин. Пластины вынимают из камеры, отмечают линию фронта, высушивают феном в вытяжном шкафу и оставляют там на 2–3 ч, затем сутки выдерживают на воздухе до полного удаления растворителя. Далее качественную хроматограмму опрыскивают 0,05%-ным раствором бромфенолового синего и по положению пятен свидетелей идентифицируют кислоты опытного образца. На пластинах, предназначенных для количественного анализа, капилляром наносят сплошной ряд пятен индикатора вертикально, в 3–4 мм от краев. Обводят зоны кислот. Участки с индикатором отрезают. Осторожно вырезают и объединяют аналогичные зоны с двух пластин. Полоски с кислотами помещают вертикально в конические колбы на 100 мл и с помощью шпателя и горячей воды смывают слой силикагеля. В колбы добавляют 3 капли фенолфталеина и титруют 0,05 н. раствором NaOH до ярко-розовой окраски.

По результатам титрования рассчитывают количество кислот (см. 4.4.2.1.).

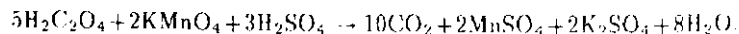
4.4.3. Количественное определение некоторых кислот вехроматографическими методами

В физиологических, биохимических и селекционных исследованиях растений часто возникает необходимость в получении данных о содержании определенных органических кислот. Ниже приводятся некоторые широко применяемые методы количественного анализа этих соединений.

4.4.3.1. ШАВЕЛЕВАЯ КИСЛОТА

В плодах и ягодах содержатся главным образом кислые и нейтральные растворимые соли щавелевой кислоты и слаборастворимая кальциевая соль, которая может откладываться в виде кристаллов. В свободной форме щавелевая кислота находится в старых листьях щавеля, шпината, свеклы и черешках ревеня.

Принцип метода. Щавелевую кислоту осаждают хлористым кальцием. Осадок оксалата кальция растворяют серной кислотой и перешедшую в раствор щавелевую кислоту титруют перманганатом калия:



Оборудование и реактивы. Настольная центрифуга, водяная баня, мерные цилиндры, конические колбы.

10%-ный раствор H_2SO_4 , аммиак, борная кислота, 0,1 н. раствор KMnO_4 , 1%-ный раствор AgNO_3 .

Реактив для осаждения щавелевой кислоты: 25 г CaCl_2 растворяют в небольшом количестве воды в мерной колбе на 500 мл, объем раствора доводят до метки 50%-ной уксусной кислотой (раствор 1); 330 г уксуснокислого натрия растворяют в 500 мл воды (раствор 2). Два раствора хорошо перемешивают и выдерживают 48 ч в холодильнике, затем фильтруют.

Ход работы. Для выделения щавелевой кислоты лучше использовать свежий растительный материал, так как высушивание при 120°C приводит к потере оксалата. 40–50 г свежей измельченной растительной ткани гомогенизируют в 50 мл воды, затем добавляют серную кислоту. Если для анализа используют сухой материал, то навеску 5 г растирают со стеклянным песком в ступке с добавлением 5 мл 10%-ной серной кислоты и небольшого количества этанола. Затем переносят гомогенат (смывая его водой) в мерный цилиндр и доводят объем смеси до 250 мл. Смесь встряхивают и оставляют на несколько часов. В раствор переходят свободная щавелевая кислота и ее соли. Если необходимо определить свободную щавелевую кислоту, экстракцию проводят нагретой до $60 - 80^\circ\text{C}$ дистиллированной водой без подкисления.

После отстаивания экстракт фильтруют через бумажный фильтр или центрифугируют при 2–3 тыс. g 10 мин. 50 мл экстракта переносят в колбу на 200 мл и добавляют по каплям 18 н. раствор аммиака до слабощелочной реакции и 1–2 г борной кислоты (ее добавляют для предотвращения осаждения винной кислоты). Затем вносят 10 мл буферного раствора хлористого кальция и оставляют на 48 ч в холодильнике.

Выпавший осадок оксалата кальция отделяют фильтрованием или центрифугированием в течение 10 мин при 1–2 тыс. g. Осадок промывают двумя-тремя порциями воды по 10 мл до отрицательной реакции на присутствие ионов хлора при добавлении капли 1%-ного раствора AgNO_3 . Далее осадок растворяют в 5 мл 10%-ной серной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане. Щавелевую кислоту титруют перманганатом калия до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение минуты.

Процентное содержание щавелевой кислоты вычисляют по

формуле:

$$X = \frac{4,5f \cdot a \cdot V_0}{H \cdot V_1} \cdot 100,$$

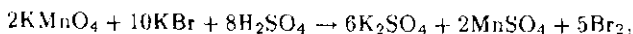
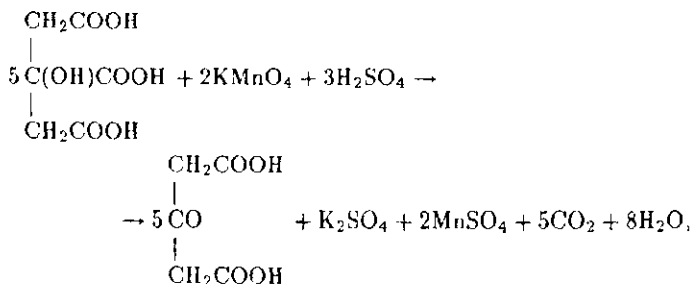
где 4,5 — титр 0,1 н. перманганата калия по шавелевой кислоте (пересчетный коэффициент шавелевой кислоты), f — поправка к титру KMnO_4 , a — объем KMnO_4 , израсходованный на титрование (мл), V_0 — общий объем экстракта (мл), V_1 — объем экстракта, взятый для анализа (мл), H — навеска сухого растительного материала (мг).

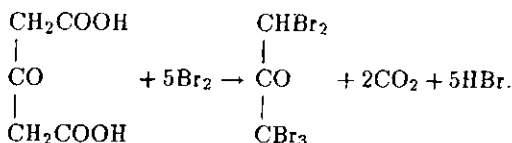
4.4.3.2. ЛИМОННАЯ КИСЛОТА

Лимонная кислота накапливается в значительных количествах в плодах и листьях. Особенно высоким содержанием лимонной кислоты отличаются плоды цитрусовых (до 90% всех кислот), ягоды клюквы и смородины, листья табака, махорки, бобовых.

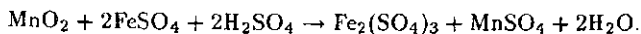
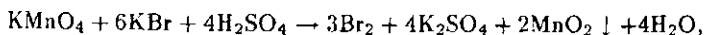
Принцип метода. Лимонную кислоту извлекают разбавленной серной кислотой и окисляют перманганатом калия в присутствии бромистого калия до образования пентабромацетона, который определяют весовым методом, извлекают хлороформом и затем разлагают сульфитом натрия. Выделившийся бромид определяют аргентометрическим способом.

Перманганат окисляет лимонную кислоту до ацетондикарбоновой кислоты, а бромид до свободного брома. Продукты реакции взаимодействуют с образованием пентабромацетона:

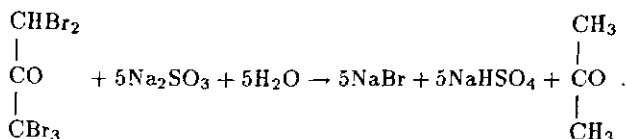




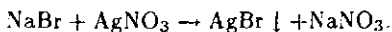
Избыток перманганата реагирует с бромидом с образованием бурого осадка диоксида марганца, который растворяют с помощью закисного железа:



Пентабромацетон разлагается при нагревании с сульфитом натрия:



Бромид взаимодействует с азотнокислым серебром:



Оборудование и реактивы. Водяная баня, делительная воронка, мерные и конические колбы, фарфоровые ступки, вытяжной шкаф.

Раствор серной кислоты в воде, 1:9 (по объему); 12%-ный раствор KBr; 4%-ный раствор KMnO_4 ; 10%-ный раствор Na_2SO_3 ; 20%-ный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$; 4%-ный раствор фосфорномолибденовой кислоты; 20%-ный раствор $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ или соли Мора $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (к 50 г соли добавляют 200 мл воды, 5 мл концентрированной серной кислоты и разбавляют водой до 250 мл); 0,01 н. раствор AgNO_3 (готовят 0,05 н раствор — 4,25 г AgNO_3 , высушенного при 100°C , растворяют в дистиллированной воде и доводят до 500 мл, хранят в темной склянке, перед употреблением разводят в 5 раз); раствор возина с метиленовой синью (0,5 г натриевой соли возина и 0,2 г метиленового синего растворяют в воде и доводят объем до 100 мл).

Ход работы. 1 г воздушно-сухого растительного материала растирают в ступке с 1 мл раствора H_2SO_4 (1:9), добавляя 5 мл воды, снова растирают. Смесь переносят в мерную колбу на 25 мл и добавляют 2 мл 4%-ного раствора фосфорномолибденовой кислоты, объем доводят до метки и оставляют на ночь. Смесь фильтруют через сухой складчатый фильтр.

Для проведения реакции образования пентабромацетона из фильтрата отбирают 2–3 пробы по 5 мл. К ним добавляют по 1 мл H_2SO_4 (1:9) и 1 мл 12%-ного KBr и перемешивают. Затем добавляют 2 мл 4%-ного $KMnO_4$, перемешивают и оставляют пробирки в вытяжном шкафу на 10 мин, периодически встряхивая. Образуется коричневый осадок MnO_2 . Если раствор бесцветный, добавляют еще 0,5 мл $KMnO_4$. К смеси приливают 2 мл 20%-ного раствора $FeSO_4$ или соли Мора до исчезновения осадка. Пробирки помещают в воду со льдом или холодильник. Раствор становится мутным, образуется белый осадок пентабромацетона.

Одну-две пробы используют для определения пентабромацетона весовым способом. Смесь с осадком переносят в стаканчик с дном-стеклянным фильтром №2. Осадок промывают водой до нейтральной реакции по метилоранжу. Стаканчик с осадком высушивают в эксикаторе над серной кислотой и взвешивают. Зная массу пустого стаканчика, определяют массу осадка. Содержание лимонной кислоты, проценты на сухую массу, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{0,483 \cdot p \cdot V_0}{H \cdot V_1} 100,$$

где 0,483 — масса лимонной кислоты, соответствующая 1 мг пентабромацетона (мг), p — масса осадка пентабромацетона (мг), H — навеска растительной ткани (мг), V_0 — исходный объем экстракта, V_1 — объем экстракта, взятый на анализ.

Из другой пробы фильтрата пентабромацетон извлекают хлороформом. Пробу переносят в делительную воронку на 100 мл и приливают 5 мл хлороформа. Воронку встряхивают 1 мин и оставляют на 2–3 мин. Отделившийся нижний слой хлороформа сливают в колбу. К водной фракции добавляют еще 5 мл хлороформа, взбалтывают и сливают нижний слой в ту же колбу. Делительную воронку освобождают, промывают водой. В нее вновь наливают хлороформный раствор, добавляют 20 мл воды, встряхивают и сливают нижний слой хлороформа в ту же

колбу. Затем в колбу добавляют 1 мл 10%-ного сернистокислого натрия и помещают ее в кипящую водяную баню в вытяжном шкафу для удаления хлороформа. Далее добавляют 20 мл воды и кипятят раствор на плитке. При этом пентабромацетон разлагается с выделением бромидов. К пробе добавляют 2 мл 20%-ного персульфата аммония для устранения влияния сульфата натрия, 2 капли возина с метиленовой синью и титруют 0,01 н. раствором азотнокислого серебра до розово-фиолетовой окраски.

Содержание лимонной кислоты, проценты на сухую массу, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{38,42 \cdot a \cdot N \cdot V_0}{N \cdot V_1} 100,$$

где 38,42 — пересчетный коэффициент лимонной кислоты для 1 мл 1 н. AgNO_3 , соответствующий 1/5 молекулярной массы лимонной кислоты (из одного моля пентабромацетона выделяется 5 молей бромидов), a — объем 0,01 н. AgNO_3 , израсходованный на титрование, N — нормальность раствора AgNO_3 . Остальные обозначения указаны выше.

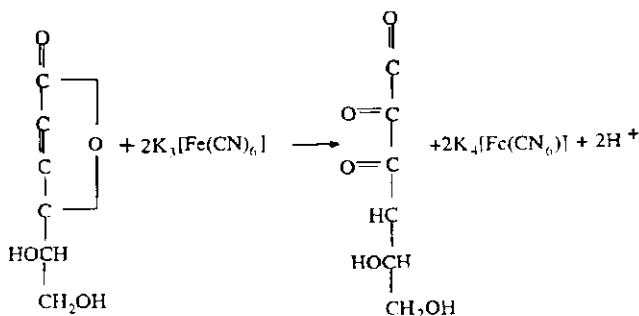
4.4.3.3. АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА

Высокое содержание аскорбиновой кислоты (витамина С) обнаружено в плодах шиповника и цитрусовых, в ягодах черной смородины, незрелых грецких орехах, капусте, картофеле, северных яблоках.

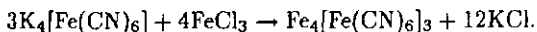
Енольная группа в лактонном кольце обуславливает легкое окисление до дегидроаскорбиновой кислоты. Аскорбиновая кислота быстро разрушается в растворах со следами меди и железа, в присутствии кислорода воздуха, на свету при нагревании. В организме аскорбиновая кислота активно участвует в окислительно-восстановительных процессах.

Восстановительная способность аскорбиновой кислоты используется в ряде методов ее определения, один из которых приводится ниже.

Принцип метода. Аскорбиновая кислота восстанавливает феррицианид калия до ферроцианида:



Ферроцианид калия в присутствии ионов трехвалентного железа образует ферроцианид железа (берлинскую лазурь):



В растворе, содержащем ионы железа, берлинская лазурь не выпадает в осадок. Определяют оптическую плотность раствора.

Оборудование и реактивы. Фотоэлектроколориметр, мерные колбы на 100 мл, кварцевый песок, фарфоровые ступки.

Буферная смесь: 0,1 М раствор цитрата натрия смешивают с 0,1 М раствором HCl (соотношение объемов 1:1, pH 3,69); свежеприготовленный 1%-ный раствор феррицианида калия, 2%-ный раствор NaF, 0,02%-ный раствор аскорбиновой кислоты, 2%-ный раствор FeCl₃.

Ход работы. 10–20 г растительного материала (мякоть или цедра лимона, листья капусты, клубни картофеля и др.) грубо измельчают стальным ножом и затем быстро растирают в ступке с кварцевым песком в равном объеме буферного раствора. Растертую массу переносят в мерную колбу и объем смеси доводят до 100 мл. Через 10 мин гомогенат фильтруют через складчатый бумажный фильтр и центрифугируют 10 мин при 3000 g. 20 мл фильтрата переносят в колбу на 100 мл, добавляют 1 мл 1%-ного раствора феррицианида калия, 1 мл 2%-ного раствора NaF и дистиллированную воду до 80–90 мл. Затем вносят 2 мл 2%-ного раствора FeCl₃, доводят общий объем смеси до 100 мл и тщательно перемешивают. В контрольный раствор вместо фильтрата вносят 20 мл буфера. Через 5 мин определяют оптическую плотность раствора на ФЭК'е при красном светофильтре в кювете толщиной 1 см.

Для построения калибровочного графика готовят серию растворов с концентрацией аскорбиновой кислоты от 2 до 12 мкг/мл: в мерные колбы на 100 мл вносят 1, 2, 3...6 мл 0,02%-ного раствора аскорбиновой кислоты, 20 мл буфера и все остальные компоненты реакционной смеси.

Содержание аскорбиновой кислоты в растительном материале рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{K \cdot V_0 \cdot V_2}{H \cdot V_1 \cdot 10},$$

где K — найденная по калибровочной кривой концентрация аскорбиновой кислоты (мкг/мл); V_0 — исходный объем экстракта (мл); V_1 — объем экстракта, использованный в анализе (мл); V_2 — объем реакционной смеси (мл); H — навеска растительного материала (г); C — содержание аскорбиновой кислоты (миллиграммы на 100 г растительного материала).

В ходе анализа не следует увеличивать содержание ионов фтора в реакционной смеси, так как это ведет к нарушению развития окраски.

Нужно отметить, что в растительном экстракте обычно имеются и другие соединения, способные восстанавливать трехвалентное железо феррицианида, поэтому полученные данные о содержании аскорбиновой кислоты оказываются завышенными (на 10–20%). Более точные результаты можно получить, определяя содержание аскорбиновой кислоты после хроматографического разделения растительного экстракта. Подходящей системой растворителей является смесь: *n*-бутанол, ледяная уксусная кислота, вода (4:1:5).

4.5. ЛИПИДЫ

Липидами называют большую группу веществ, растворимых в органических растворителях и нерастворимых в воде, в состав которых входят высшие алкильные радикалы. К липидам относятся высшие углеводороды, спирты, альдегиды, жирные кислоты и их производные, пигменты и жирорастворимые витамины. Традиционно, однако, термином "липиды" обозначают соединения, содержащие остатки спиртов и жирных кислот, соединенные сложноэфирной или амидной связью. Согласно одной из классификаций, липиды подразделяют на нейтральные и полярные. Нейтральные липиды — моно-, ди- и триглицериды,

воска, стерины. Полярные — фосфо-, глико- и сульфолипиды — относятся к сложным липидам, так как включают, кроме двух основных компонентов, дополнительные структуры (углеводы, азотистые основания, остатки фосфорной и серной кислоты и др.).

Биологическое значение липидов очень велико. Фосфолипиды и стерины являются обязательными компонентами мембран животной и растительной клетки, в значительной степени определяют их структуру и функции, участвуют в передаче сигналов и запуске регулярных механизмов. Гликолипиды (главным образом галактозилдиглицериды) специфичны для мембран хлоропластов. Глицериды как запасные вещества накапливаются в семенах и мякоти плодов растений, это растительные масла, имеющие большое хозяйственное значение. Воск, содержащийся в кутикуле, выполняют защитную и структурную функции.

Существует ряд методических подходов для изучения липидных соединений. Спектроскопические методы, такие, как УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопия, а также масс-спектроскопия позволяют обнаружить характерные связи и группы атомов, по которым идентифицируют классы липидов. Биосинтез и метаболизм липидов изучают с применением радиоизотопных методов. Ведущее значение в липидологии имеет хроматография, тонкослойная, колоночная, бумажная и газожидкостная. С помощью хроматографических методов осуществляется разделение липидных смесей на отдельные классы и индивидуальные компоненты, определяется их качественный и количественный состав.

4.5.1. Выделение липидов

Липиды — довольно лабильные соединения; для получения нативных препаратов важно выбрать корректный способ фиксации растительного материала. Обычно липиды извлекают с помощью многократной экстракции различными органическими растворителями. Широко применяется смесь хлороформа с метанолом по методу Дж.Дж. Фолча (1951). Чтобы избежать окисления липидов, следует использовать перегнанные растворители. Для экстракции сильно ненасыщенных липидов кислород из растворителей удаляют пропусканием азота.

4.5.1.1. ЭКСТРАКЦИЯ ЛИПИДОВ ИЗ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Липиды экстрагируют смесью хлороформа и метанола (2:1), экстракт отмывают от водорастворимых примесей с помощью 0,1%-ного раствора NaCl и высушивают.

Оборудование и реактивы. Фарфоровые ступки, пробирки с притертыми пробками, фильтр Шотта №3, пастеровская пипетка, центрифуга со стеклянными пробирками, роторный испаритель.

Хлороформ, метанол, 0,1%-ный водный раствор NaCl.

Ход работы. Навеску сырой растительной ткани (2–10 г) растирают в фарфоровой ступке в двух объемах смеси хлороформа и метанола (2:1 по объему) и переносят в широкую пробирку с притертой пробкой (шлиф 29), добавляя дополнительные порции хлороформ-метаноловой смеси. Общий объем экстракта составляет около 16 мл на 1 г сырой массы. Смесь тщательно перемешивают и оставляют для экстракции на 30–60 мин, периодически взбалтывая. Затем суспензию фильтруют через складчатый бумажный фильтр, промывают новыми порциями хлороформ-метанола (2:1), так чтобы объем фильтрата составил 20 мл на 1 г ткани.

При работе с зелеными частями растений рекомендуется гомогенизировать ткань в кипящем метаноле, так как она содержит высокостабильный фермент фосфолипазу D, разрушающийся только в кипящей воде или спирте. Далее добавляют хлороформ и метанол, так чтобы соотношение их объемов составило 2:1.

После фильтрования экстракт отмывают от нелипидных веществ, извлекаемых из гомогената спиртом (сахаров, аминокислот, солей). К фильтрату добавляют 0,1%-ный раствор NaCl из расчета 0,2 мл на 1 мл липидного экстракта. Пробирки, закрытые пробками, энергично встряхивают до образования белой эмульсии. Далее пробы центрифугируют в стеклянных пробирках при 600 g 10 мин. Эмульсия разделяется на две фазы. Верхний слой, водно-метаноловый, осторожно отсасывают пастеровской пипеткой, нижний, хлороформный, содержащий липиды, промывают 10 мл смеси вода-метанол-хлороформ (47:48:3). Суспензию встряхивают до получения эмульсии, центрифугируют и отсасывают верхнюю фазу. Процедуру выполняют три раза. Промытый экстракт липидов фильтруют через фильтр Шотта №3 и добавляют по каплям метанол до тех пор, пока фильтрат не станет прозрачным. Затем растворитель упар-

ривают на роторном испарителе при температуре 40°C. При более высокой температуре липиды могут вспениваться, что способствует их окислению. В остатке содержатся липиды, а также пигменты и другие жирорастворимые соединения.

4.5.1.2. ЭКСТРАКЦИЯ ЛИПИДОВ ИЗ СУБКЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Препараты субклеточных частиц (микросом, митохондрий, хлоропластов и др.), предназначенные для анализа липидов, необходимо предохранять от автоокисления и расщепления липолитическими и протеолитическими ферментами. Выделение следует проводить на холоду, защищать суспензию частиц от вспенивания, яркого света, интенсивного контакта с кислородом воздуха. В среду выделения полезно добавить ионол, α -токоферол или другие антиоксиданты. Желательно проводить экстракцию липидов сразу после выделения субклеточных элементов. Если препарат не может быть использован немедленно, его следует быстро заморозить и хранить под азотом.

Ход работы. 1–5 мл суспензии субклеточных элементов в растворе сахарозы помещают в пробирку с притертой пробкой и прибавляют смесь хлороформ-метанол (1:2): 3,75 мл на 1 мл суспензии. Смесь выдерживают 1–2 ч, периодически встряхивая. Затем центрифугируют 10 мин при 1000 g. Верхнюю водно-метаноловую фазу отсасывают, а нижнюю промывают два–три раза смесью вода-метанол-хлороформ (47:48:3), каждый раз центрифугируют и отбрасывают верхнюю фазу. Нижнюю хлороформную фазу фильтруют через фильтр Шотта и упаривают. Остаток растворяют в небольшом объеме смеси хлороформ-метанол (2:1) или хлороформа.

Если липидный экстракт необходимо долго хранить или в нем содержится много ненасыщенных липидов, полезно добавить антиоксидант бутилированный гидрокситолуол в концентрации 0,05%.

4.5.2. Некоторые методы анализа общих липидов

В суммарных липидных экстрактах, а также в маслах, получаемых из семян, могут быть определены некоторые свойства липидов, такие как: количество свободных жирных кислот, средняя молекулярная масса жирных кислот, степень их ненасыщенности и др. Липидный экстракт после выпаривания делают

на аликвотные части, которые используют для различных анализов.

Чтобы определить массу липидов в экстракте, аликвоту переносят в новую пробирку с притертой пробкой или бюкс, предварительно взвешенные на аналитических весах, и высушивают до постоянной массы при 40°C. Определяют разницу масс пробирки с липидами и пустой пробирки. Рассчитывают процентное содержание липидов в сырой и сухой ткани растения.

4.5.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОДНОГО ЧИСЛА

Свойство углеводов легко присоединять галогены по двойным связям используют для оценки степени ненасыщенности жирных кислот в маслах, жирах, липидных экстрактах, фракциях жирных кислот. Определяют так называемое *иодное число*, которое показывает, сколько граммов иода, эквивалентных количеству галогена, присоединяется к 100 г липидов.

Принцип метода. Бром присоединяется к жирной кислоте по месту двойной связи. Интенсивно реагирует соединение брома с пиридином в уксусной кислоте. Непрореагировавший бром взаимодействует с иодистым калием. Выделившийся иод титруют тиосульфатом натрия в присутствии крахмала.

Реактивы. 0,05 н. раствор пиридиндибромиды: к раствору концентрированной серной кислоты (2,5 г или 1,85 мл в 5 мл ледяной уксусной кислоты) прибавляют раствор пиридина (2,0 г или 2,06 мл в 5 мл ледяной уксусной кислоты), смесь охлаждают, прибавляют к ней 2,0 г (0,63 мл) брома и доводят ее объем до 500 мл ледяной уксусной кислотой; 10%-ный раствор KI; 1%-ный раствор крахмала: 1 г крахмала растворяют в 100 мл 13%-ного раствора KCl, нагревают до кипения и охлаждают; 0,02 н. титрованный раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Ход работы. Хлороформный раствор липидов (2–5 мг) помещают в коническую колбу на 50 мл с притертой пробкой. К 5 мл экстракта прибавляют 5 мл раствора пиридиндибромиды, смесь тщательно перемешивают и оставляют при комнатной температуре в темноте на 15 мин. Затем прибавляют 0,5 мл раствора иодистого калия, 0,5 мл воды и несколько капель раствора крахмала. Выделившийся иод титруют стандартным раствором тиосульфата натрия до исчезновения голубой окраски. В контрольном опыте вместо липидного экстракта используют хлороформ в равном объеме.

Иодное число вычисляют по разности между титрованием контрольного и опытного раствора:

$$\text{И.ч.} = \frac{100(a - b)T}{N},$$

где a, b — объемы тиосульфата, израсходованные на титрование контрольной пробы и липидного экстракта соответственно (мл), T — титр 0,02 н. раствора тиосульфата по иоду ($T = 0,02 \cdot 12,7 = 0,254$), N — навеска липидов (мг).

Число двойных связей в расчете на моль равно произведению иодного числа на молекулярную массу липида, отнесенному к удвоенной атомной массе иода.

4.5.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА, ЧИСЛА ОМЫЛЕНИЯ И ЭФИРНОГО ЧИСЛА

Кислотное число — количество миллиграммов едкого калия, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира. Величина кислотного числа растительных масел не постоянна. Свободных жирных кислот относительно много в незрелых семенах и меньше в зрелых. Содержание свободных жирных кислот резко повышается при прорастании семян.

Принцип метода. Кислые компоненты липидного препарата нейтрализуют титрованным раствором щелочи.

Реактивы. 0,025 н. спиртовой раствор КОН (2,805 г КОН растворяют в 35 мл перегнанного метанола, раствор центрифугируют, прозрачный супернатант разбавляют метанолом до 50 мл, к 5 мл раствора добавляют 20 мл дистиллированной воды и разбавляют метанолом до 200 мл, нормальность водно-метанолового раствора определяют титрованием 0,01 н. HCl); 1%-ный раствор фенолфталеина в 90%-ном этаноле.

Ход работы. Хлороформный раствор, содержащий 10–50 мг липидов, выпаривают. Остаток растворяют в 5 мл смеси метанол-вода (9:1), прибавляют 2 капли индикатора и нагревают на плитке почти до кипения. Горячий раствор титруют спиртовым раствором гидроокиси калия. В контрольном опыте титруют 5 мл растворителя. В данном анализе метанол может быть заменен на этанол.

Кислотное число рассчитывают по формуле:

$$\text{К.ч.} = \frac{T(b-a)}{N},$$

где а, б — объемы раствора 0,025 н. щелочи, израсходованные на титрование контрольной и опытной пробы соответственно (мл), T — титр КОН (мг), N — навеска липидов (г).

Кислотное число лишь относительно отражает содержание свободных жирных кислот в липидном экстракте, так как в нем могут находиться кислые фосфо- и сульфоллипиды, другие кислые липиды, которые нейтрализуются щелочью.

Числом омыления называют количество миллиграммов едкого калия, необходимое для нейтрализации всех свободных и связанных кислот, содержащихся в 1 г жира. Число омыления характеризует среднюю величину молекулярной массы жирных кислот, входящих в состав данных липидов. Высоким числам омыления соответствуют низкие величины массы жирных кислот, и наоборот.

Принцип метода. Липиды гидролизуют кипячением в растворе гидроокиси калия. Освобождающиеся жирные кислоты реагируют со щелочью. Избыток щелочи титруют соляной кислотой.

Оборудование и реактивы. Круглодонные колбы, обратные холодильники, водяная баня, роторный испаритель.

0,3 н. раствор КОН в 90%-ном метаноле (10 мл 3 н. водного раствора КОН разбавляют метанолом до 100 мл); 0,3 н. водный раствор HCl; 1%-ный раствор фенолфталеина в 90%-ном этаноле.

Ход работы. В круглодонную колбу помещают хлороформный экстракт, содержащий 15–30 мг липидов, выпаривают досуха на роторном испарителе и к остатку прибавляют 5 мл 0,3 н. спиртового раствора гидроокиси калия. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане. Омыление заканчивают, когда жидкость в колбе становится прозрачной и на дне колбы исчезают капельки масла. Одновременно готовят контрольную пробу: кипятят в колбе такое же количество щелочи без липидов. После охлаждения в пробы добавляют 2–3 капли раствора индикатора и оттитровывают избыток щелочи 0,3 н. раствором соляной кислоты.

Рассчитывают число омыления по формуле:

$$\text{Ч.о.} = \frac{T(a-b)}{N},$$

где а, б — объемы HCl, пошедшие на титрование контрольной и опытной пробы соответственно (мл), T — титр кислоты по КОН

(мг), Н — навеска липидов (г).

На основании определения числа омыления и кислотного числа вычисляют *эфирное число* — количество миллиграммов едкого калия, которое необходимо для нейтрализации освобождающихся при омылении жирных кислот в 1 г жира. Это разность между числом омыления и кислотным числом.

4.5.3. Разделение липидов методом тонкослойной хроматографии

Широко распространенным методом разделения смесей липидов на классы и индивидуальные компоненты является хроматография в тонком слое. Этот метод не требует сложной аппаратуры, отличается высокой разрешающей способностью, позволяет относительно быстро разделять небольшие количества веществ. Тонкослойная хроматография пригодна и для разделения значительных количеств липидов (в пределах 50–300 мг). В качестве адсорбента применяют силикагель-полигидрат окиси кремния различных марок: G, H, D, C, L. Хорошее разделение липидов достигается на отечественном силикагеле марки КСК. Используют готовые пластинки с тонким слоем силикагеля "Силуфол", "Мерк", "Анаб", а также стеклянные пластинки, закрепленные силикатом, производства таллинской экспериментальной мастерской.

Липидный экстракт наносят на пластинки с тонким слоем силикагеля и проводят разделение в специальных системах растворителей. Хроматограммы проявляют парами иода или опрыскиванием серной кислотой и другими реагентами.

Оборудование и реактивы. Стеклянные пластинки различных размеров, столик с горизонтальной поверхностью, капилляры и микрошприцы, пульверизаторы, стеклянные камеры с крышками.

Силикагель марки КСК в гранулах размалывают на шаровой мельнице в течение 2,5–3 ч. Фракцию частиц размером 20–40 мкм получают путем отмучивания. В кристаллизатор на 2 л высыпают 200 г размолотого силикагеля, наливают дистиллированную воду и взбалтывают силикагель до образования однородной взвеси. Через 5 мин после оседания наиболее крупных частиц взвесь переливают в другой сосуд и оставляют на 25 мин. За это время осаждаются частицы размером 20–40 мкм. Неосевшую взвесь частиц сливают. Силикагель, используемый

для разделения фосфолипидов, подвергают отмывке соляной кислотой от ионов железа. К 150–200 г отмученного силикагеля добавляют 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и 0,5 л воды, силикагель взмучивают. Через 2–3 ч надосадочную жидкость удаляют, силикагель промывают водой до исчезновения кислой реакции в надосадочной жидкости. Силикагель высушивают 48 ч при 120°C.

Смеси растворителей: гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (80:20:1), ацетон-уксусная кислота-вода (100:2:1), хлороформ-метанол-7 н. NH_4OH (65:25:4). Кристаллический иод, 50%-ная серная кислота.

Ход работы. Для разделения липидов обычно используют пластинки размером 4,5 · 12, 13 · 18, 18 · 24 см. При приготовлении пластинок для аналитического разделения берут 15 мг силикагеля и 0,04 мл воды на 1 см² пластинки, для количественного определения — 40 мг силикагеля и 0,1 мл воды. Силикагель растирают с водой в ступке до образования гомогенной массы, ее переносят на пластинку и оставляют на ночь на столике с горизонтальной поверхностью. Перед нанесением липидного экстракта пластинки активируют 20 мин при 110°C в термостате. При нагревании часть связанной с силикагелем воды удаляется и освобождаются гидроксильные группы, с которыми взаимодействуют молекулы липидов.

Хлороформ-метаноловый экстракт липидов наносят капилляром или шприцем полосой или отдельными пятнами на расстоянии 1,5 см от края пластинки. После высыхания пятен пластинку помещают в стеклянную камеру с крышкой, куда предварительно (за 30–60 мин) наливают смесь для разделения липидов. Пластика должна быть погружена в растворитель примерно на 8 мм. Разделение продолжается 30–40 мин. Для стандартизации результатов важно поддерживать постоянную температуру, равномерное насыщение камеры парами. После окончания разделения отмечают иглой линию фронта и высушивают пластинку на воздухе. Затем пластинку помещают в закрытую камеру с парами иода. Фракции липидов проявляются в виде желтых и коричневых пятен на белом фоне. Пятна обводят иглой, так как они постепенно обесцвечиваются. Хроматограммы можно опрыскивать 50%-ной серной кислотой, все липидные фракции обугливаются после нагревания пластинок 20 мин при 180°C. Рассчитывают R_f фракций.

Разделение нейтральных и полярных липидов основано на

Таблица 4.3. Данные хроматографического анализа нейтральных липидов колеоптилей кукурузы (по Н. Ф. Синютиной и др., 1978)

Номер фракции	Компонент липидов	Rf	Пары мода	Стандартные свидетели
1	Полярные липиды	Старт	+	Лецитин
2	Пигменты	0,03	-	Нет
3	Моноацил- глицериды	0,07	+	" -
4	Стерины	0,11	+	Холестерин
5	Жирные кислоты	0,17	+	Пальметиновая, стеариновая, олеиновая кислоты
6	Диацилглицериды	0,26	+	Дипальмитилглицерин
7	Триглицериды	0,36	+	Трикаприлглицерин, трилауринглицерин
8	Эфиры стерinov	0,51	+	Холестерилацетат
9	Эфиры жирных кислот	0,66	+	Метиловые эфиры паль- митиновой, стеарино- вой, и олеиновой кислот

том, что нейтральные липиды значительно слабее удерживаются неподвижной хроматографической фазой и легко элюируются неполярными растворителями, такими как: гексан, петролейный эфир, бензол; полярные липиды удерживаются адсорбентом прочнее и для их элюции требуются высокополярные растворители. Для разделения нейтральных липидов используют систему растворителей: гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (80:20:1). Идентификацию полученных фракций проводят по стандартным свидетелям, очищенным липидным препаратам, которые наносят на пластинку параллельно с исследуемым препаратом. В этой системе растворителей на старте остаются полярные липиды, а нейтральные разделяются на фракции (табл. 4.3).

Разделение полярных липидов проводят в системе ацетон-уксусная кислота-вода (100:2:1). Для определения полученных фракций используют свидетели и специальные реагенты, описанные ниже. Данная система позволяет разделить гликолипиды на фракции, фосфолипиды остаются на старте, на фронте находятся нейтральные липиды (табл. 4.4).

Таблица 4.4. Данные хроматографического анализа полярных липидов колеоптилей кукурузы (по Н. Ф. Синютиной и др., 1978)

Номер фракции	Компонент липидов	Rf	Антроп	Стандартные свидетели
1	Фосфолипиды	Старт	-	Лецитин
2	Сульфоллипиды	0,06	+	Нет
3	Дигликозилдиглицериды	0,27	+	Дифосфоглицерилглюкоза
4	Моноглицериддиглицериды	0,59	+	Нет
5	Нейтральные липиды	0,89	-	Стандартные нейтральные липиды

Фосфолипиды делают в системе растворителей: хлороформ-метанол-7 н. NH_4OH (65:25:4) и идентифицируют с помощью стандартных препаратов липидов и специальных проявителей (табл. 4.5).

Таблица 4.5. Данные хроматографического анализа фосфолипидов колеоптилей кукурузы (по Н. Ф. Синютиной и соотр. 1978)

Номер фракции	Фосфолипиды	Rf	Реактив на фосфор	Стандартные свидетели
1	Фосфатидилсерин и фосфатидилинозиты	0,32-0,37	+	Фосфатидилсерин
2	Фосфатидилхолины	0,48-0,51	- " -	Фосфатидилхолин
3	Фосфатидилэтанолламины	0,61	- " -	Фосфатидилэтанолламин
4	Фосфатидные кислоты	0,75	Следы	Фосфатидная кислота
5	Дифосфатидилглицерины	0,89	- " -	Дифосфатидилглицерин

Различные системы растворителей для разделения липидов приведены в методическом руководстве М. Кейтса (1975).

Реагенты для проявления липидов на тонкослойных хроматограммах

Родамин 6Ж наряду с парами иода и серной кислотой относится к неспецифическим реактивам. Готовят 0,03%-ный рас-

твор родамина в этаноле. Пластинки опрыскивают во влажном состоянии, просматривают в ультрафиолетовом свете. Фосфатидилсерин, монофосфоинозитид и фосфатидная кислота приобретают лиловое окрашивание, фосфатидилэтанолламин и холинсодержащие фосфолипиды окрашиваются в желто-оранжевый цвет.

Реактив для обнаружения фосфолипидов известен в модификации В. Е. Васьковского, Е. Ю. Костецкого (1968). Готовят раствор 1 (16 г молибдата аммония растворяют в 120 мл дистиллированной воды) и раствор 2 (40 мл концентрированной HCl и 10 мл ртути растворяют в течение 30 мин в 80 мл раствора 1 и фильтруют). 200 мл концентрированной H_2SO_4 добавляют к раствору 2, затем смесь по каплям приливают к остатку раствора 1. Объем охлажденной смеси доводят водой до 1 л. Пластинки опрыскивают реагентом, высушивают, на них проявляются голубые пятна на белом фоне.

Нингидрик — реагент на выявление первичных аминогрупп фосфатидилсерина и фосфатидилэтанолламина. 0,3 г нингидрина растворяют в 100 мл бутанола и добавляют 3 мл ледяной уксусной кислоты. После опрыскивания и нагревания пластинок в течение 30 мин при $110^\circ C$ на них проявляются розовые пятна.

Реактив Драгендорфа служит для проявления пятен холинсодержащих липидов. 1,7 г $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ растворяют в 100 мл 20%-ной уксусной кислоты (раствор 1); 40 г KI растворяют в 100 мл воды (раствор 2). Смешивают 20 мл раствора 1, 5 мл раствора 2 и 70 мл воды. При комнатной температуре выявляются оранжевые пятна.

Аммиачный раствор серебра применяется для обнаружения фосфоинозитидов. Реактив состоит из равных объемов 0,1 н. $AgNO_3$ и 1 н. NH_3 . Пластинки после обработки нагревают при $110^\circ C$ до появления коричневых пятен.

Антроновый реактив используют для выявления гликолипидов. 0,2% антрона растворяют в концентрированной H_2SO_4 . После опрыскивания пластинок на них появляются коричневые пятна.

α -Нафтол — реактив для обнаружения гликолипидов. Готовят 0,05%-ный раствор α -нафтола в 100 мл смеси метанол-вода (1:1). α -Нафтол перекристаллизован из смеси гексан-хлороформ. Хроматограммы опрыскивают раствором α -нафтола, высушивают и опрыскивают раствором серной кислоты ($95H_2SO_4$:

5H₂O по объему). Нагревают при 110°C до максимального проявления окраски. Гликолипиды проявляются в виде сине-фиолетовых пятен, другие полярные липиды — желтых, а холестерин — серо-красных.

Раствор хлорного железа применяют для определения стерина и эфиров стерина. 50 мг FeCl₃·6H₂O растворяют в 90 мл воды, затем добавляют 5 мл ледяной уксусной кислоты и 5 мл концентрированной серной кислоты. Через 2–3 мин после опрыскивания хроматограммы нагревают при 100°C. Стерины дают красные и фиолетовые пятна, эфиры стерина проявляются несколько позднее. Продолжительное нагревание вызывает обугливание пятен всех липидов.

4.5.4. Количественное определение липидов, разделенных методом тонкослойной хроматографии

Для определения количества липидов во фракциях липидные пятна, проявленные иодом, после обесцвечивания соскабливают с пластинок и элюируют 10–15 мл смеси хлороформ–метанол (2:1). Силикагель отделяют фильтрованием через фильтр Шотта №4. Растворитель упаривают на роторном испарителе.

4.5.4.1. НЕЙТРАЛЬНЫЕ ЛИПИДЫ

Бихроматным методом И.С.Амента (1964) можно определить количественное содержание различных липидных фракций, в том числе и нейтральных липидов.

Принцип метода. Метод основан на реакции восстановления двухромовой кислоты липидами. Снижение поглощения при 350 нм пропорционально количеству окисленных липидов.

Оборудование и реактивы. Водяная баня, спектрофотометр.

Бихроматный реагент: 2,5 г K₂Cr₂O₇ растворяют в 1 л 36 н. H₂SO₄.

Ход работы. В пробирки с липидами наливают от 1 до 9 мл бихроматного реагента и помещают их в водяную баню на 45 мин, периодически встряхивая. Чтобы определить 20–25 мкг липидов, требуется 1 мл бихроматного реагента, 60–140 мкг — 3 мл, большего количества — 6–9 мл. Из охлажденных проб берут по 0,5 мл и добавляют 25 мл воды. Содержимое пробирок тщательно перемешивают. Через 30 мин измеряют оптическую плотность при 350 нм. В качестве контрольных образцов используют элюаты силикагеля чистых участков пластинки. Для

различных липидов строят калибровочные кривые с использованием стандартных препаратов стерина, триацилглицеридов, жирных кислот, эфиров стерина, фосфолипидов. Нижний предел чувствительности метода — примерно 15 мкг липидов.

4.5.4.2. ФОСФОЛИПИДЫ

Фосфолипиды определяют по наличию остатков фосфорной кислоты методом Г. Бартлетта (1959) с использованием в качестве восстановителя айконогена.

Принцип метода. Фосфолипиды подвергают гидролизу и в гидролизате определяют неорганический фосфор. Ортофосфат, взаимодействуя с молибдатом аммония, образует комплексное соединение фосфорномолибденовую кислоту, которая восстанавливается айконогеном в окрашенную форму — молибденовую синь.

Оборудование и реактивы. Спектрофотометр, нагревательный блок, вытяжной шкаф, водяная баня.

72%-ная хлорная кислота, 5%-ный водный раствор молибдата аммония.

Раствор айконогена: 0,125 г айконогена (1-амино-8-нафтол-3,6-дисульфокислоты) растирают в ступке с 0,25 г Na_2SO_3 и растворяют в 50 мл 15%-ного раствора метабисульфита натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, смесь встряхивают и оставляют в темноте, через 30 мин фильтруют через бумажный фильтр, хранят в темной склянке в холодильнике 2 месяца.

Стандартный раствор KH_2PO_4 : 0,2197 г безводной соли растворяют в 500 мл бидистиллированной воды (раствор содержит 100 мкг Р в 1 мл), исходный раствор разбавляют в 50 раз.

Ход работы. Пробы фосфолипидов сжигают в 0,7 мл HClO_4 при 170°C в течение двух часов до получения бесцветного раствора. Пробирки с пробами охлаждают, в них добавляют по 1 мл воды, 0,2 мл раствора молибдата аммония и 0,2 мл раствора айконогена. Общий объем смеси доводят водой до 5 мл. Пробы перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Появляется голубое окрашивание проб. Измерения оптической плотности проводят на спектрофотометре при 830 нм.

Калибровочную кривую строят по стандартному раствору KH_2PO_4 , в образцы вносят 0,5–5 мкг Р.

Содержание фосфолипидов определяют, умножая количество фосфора в пробе на переводный коэффициент, равный отноше-

нию молекулярной массы фосфолипида к атомной массе фосфора.

4.5.4.3. ГЛИКОЛИПИДЫ

Гликолипиды определяют по содержанию углеводов микрометодом, разработанным Н. С. Радиным и сотр. (1955).

Принцип метода. Содержание галактозы в липидах определяется с помощью антронового реактива. Преимущество метода заключается в том, что галактозу определяют без предварительного гидролиза галактолипидов.

Оборудование и реактивы. Водяная баня, фотоэлектроколориметр.

85%-ный раствор ортофосфорной кислоты (совершенно прозрачный); антроновый реактив: 2%-ный раствор антрона, приготовленный на концентрированной серной кислоте (может храниться в холодильнике 2 недели), перед анализом смешивают 4,5 мл антронового реактива с 18 мл воды и 37,5 мл концентрированной серной кислоты.

Ход работы. В пробирки с сухим остатком липидных фракций приливают 2 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты. Пробирки закрывают пробками и нагревают на водяной бане 15 мин. При этом осадок растворяется. Затем пробирки 5 мин охлаждают в ледяной бане. К пробам прибавляют 5 мл рабочего раствора антрона. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и нагревают 25 мин на водяной бане при 90°C. Растворы приобретают зеленую окраску. Пробы охлаждают в ледяной воде 5 мин и фотометрируют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре ($\lambda = 633$). Калибровочную кривую строят по стандартным растворам галактозы (50–250 мкг в 1 мл).

Содержание галактолипидов рассчитывают, умножая количество галактозы в пробе на переводный коэффициент, который равен отношению молекулярной массы галактолипида к произведению молекулярной массы галактозы на число ее молекул.

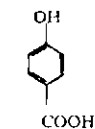
4.6. ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Фенольные соединения — обширная группа веществ вторичного происхождения, широко представленная в растительном мире. В основе их строения — бензольное кольцо с одной или несколькими гидроксильными группами, которые придают фенолам свойства слабых кислот. В растениях фенолы главным образом присутствуют в виде гликозидов и сложных эфиров.

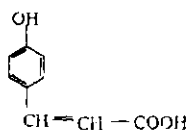
Простейшие фенольные соединения — ди- и трифенолы — редко встречаются в тканях растений. Гидрохинон может обнаруживаться в форме гликозида. Наиболее широко распространены три группы фенольных соединений: соединения $C_6 - C_1$ ряда — оксibenзойные кислоты и их производные (альдегиды и спирты); соединения $C_6 - C_3$ ряда — оксикоричные кислоты, их производные и оксикумарины; соединения $C_6 - C_3 - C_6$ ряда — флавоноиды, изофлавоноиды и неофлавоноиды. Флавоноиды — производные флавана — самая многочисленная группа фенольных соединений, она включает катехины, лейкоантоцианы, антоцианы, флаванолы, флавоны, флавонолы, флаванолы, отличающиеся по степени окисления гетероцикла (C_3), а также близкие к ним халконы и ауруны. Разнообразие флавоноидов обусловлено различным расположением гидроксильных и метоксильных групп у бензольных ядер, а также существованием множества гликозидных производных с одним — четырьмя остатками сахаров. В растениях найдены также соединения $C_6 - C_2$ ряда — стильбены, фенилуксусные кислоты, ацетофенолы, липидорастворимые пластохиноны и убихиноны и другие соединения. К полимерным фенольным соединениям относятся дубильные вещества, лигнин, меланины.

Фенольные соединения выполняют разнообразные функции в растительном организме. Убинон и пластохинон участвуют в электрон-транспортных цепях хлоропластов и митохондрий. Связанные формы фенольных соединений выполняют запасную и защитную функции. Ряд фенольных соединений играет важную роль в процессах роста и развития растений.

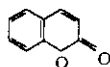
Структура различных типов фенольных соединений приведена ниже.



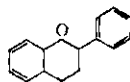
п-Оксibenзойная
кислота



п-Оксикоричная
кислота



Кумарин



Флаван

Влияние фенолов может осуществляться через ауксиновую систему. Ортодифенолы ингибируют активность ауксиноксидазы, тогда как монофенолы и метадифенолы стимулируют ее.

Некоторые фенольные соединения входят в состав β -ингибиторного комплекса вместе с абсцизовой кислотой. В роли ингибиторов роста и прорастания семян часто выступают салициловая, паракумаровая кислоты, оксикумарины, нарингенин, некоторые изофлавоны. Иногда наблюдается активирующее действие фенолов — кофейной, ванилиновой, хлорогеновой кислот. В отличие от фитогормонов фенолы накапливаются в растениях и эффективны в значительно более высоких концентрациях. Флавоноиды могут действовать в качестве аллелопатических агентов, они определяют устойчивость растений к заражению патогенными грибами. Яркая окраска цветков, плодов и листьев, привлекающая насекомых-опылителей и птиц, обусловлена антоцианами, флавонами и флавонолами.

Важным свойством фенольных соединений является способность к быстрому ферментативному, а также неферментативному окислению с помощью атмосферного кислорода. Окисление резко ускоряется в щелочной среде и при интенсивном освещении, что вносит трудности в выделение этих соединений из растительного материала, обладающего высокой оксидазной активностью.

4.6.1. Экстракция фенольных соединений

Выделение фенольных соединений возможно как из свежего, так и высушенного растительного материала. Желательно проводить фиксацию для предотвращения деятельности окислительных ферментов. Самой удачной является фиксация жидким азотом с последующей лиофилизацией. Может быть использована фиксация кипящим спиртом. Иногда проводят обработку сухим жаром в термостате при 105°C с дальнейшим высушиванием при температуре не выше 60°C .

Выбор способа экстракции зависит от состава изучаемого объекта и тех веществ, которые требуется выделить в первую очередь. Обычно применяют два подхода для выделения фенольных соединений, основанные на растворимости этих веществ в воде, спиртах, диэтиловом и уксусно-этиловом эфирах, ацетоне.

Один из способов включает последовательную экстракцию растворителями возрастающей полярности. Сначала диэтиловым эфиром извлекают оксibenзойные и оксикоричные кислоты, агликаны флавонолов и некоторые другие фенольные соединения. Достоинство эфира состоит в том, что он извлекает от-

носителем мало примесей и отгоняется при низкой температуре. Далее растительный материал обрабатывают этилацетатом, этанолом или *n*-бутанолом. Этилацетат извлекает мономерные лейкоантоцианы, моно- и дигликозиды флавонолов, хлорогеновую кислоту и родственные ей соединения. В бутанол переходят полигликозиды флавонолов, ацилированные флавоноиды, олигомерные лейкоантоцианы, конденсированные фенольные соединения. При этом способе экстракции белки, нуклеиновые кислоты и сахара не переходят в экстракт, но в эфирную и этилацетатную фракцию попадают частично хлорофиллы и терпеноиды.

Другой способ экстракции начинается с обработки горячей водой или водным метанолом (этанолом). Фенольные вещества переходят в экстракт наиболее полно. Большинство терпеноидов и хлорофиллы не переходят в раствор, однако извлекаются растворимые белки, сахара, аминокислоты. Водно-спиртовый экстракт фракционируют далее с помощью растворителей различной полярности (эфира, этилацетата, бутанола).

Очистку экстрактов фенольных соединений от липидов, хлорофилла, терпеноидов осуществляют различными путями. Зафиксированный растительный материал перед экстракцией фенолов обрабатывают низкокипящей фракцией петролейного эфира (40 – 60°C). Упаренный экстракт фенолов очищают двумя-тремя промывками подогретой водой, нерастворимые в воде вещества отделяют центрифугированием или экстрагируют эфиром, хлороформом, бензолом, при подщелачивании водного раствора фенолов содой. Применяют метод адсорбционной хроматографии на полиамидах и поливинилпирролидоне. Нефенольные вещества не задерживаются на полимере, фенольные оксигруппы взаимодействуют с амидными группами полимера. Адсорбированные фенолы элюируют затем органическими растворителями. Очистка от пигментов возможна и на стадии хроматографического разделения на бумаге. По методу В. И. Кефели и сотр. (1973), после нанесения экстракта на стартовую линию бумагу перегибают на расстоянии 10 см от старта и местом изгиба погружают в сосуд с толуолом. Толуол, двигаясь в сторону стартовой линии, захватывает неполярные примеси и уводит их к краю бумаги, который затем отрезают. Очистка от водорастворимых веществ, сахаров, аминокислот и др. также возможна при хроматографировании с использованием оводненных систем растворителей или посредством нескольких спо-

циальных хроматографирований, например, в 1,5%-ном водном растворе соляной кислоты.

Ниже приводятся примеры методик выделения фенольных соединений.

Экстракция по методу

А. П. Волынец, С. М. Маштакова (1973)

Основана на первичной обработке диэтиловым эфиром.

Оборудование и реактивы. Аппарат для встряхивания жидкостей, роторный испаритель, делительная воронка, водяная баня.

70%-ный водный этанол, 96%-ный этанол, петролейный эфир, 2 н. HCl , 1 н. NaHCO_3 . Очищенный подкисленный диэтиловый эфир: для освобождения от перекисей 1 л эфира встряхивают в делительной воронке с 100 мл 20%-ного метабисульфита натрия или калия, водную фракцию отделяют, эфир встряхивают со 100 мл 20%-ного раствора NaOH или KOH , а затем с дистиллированной водой 4–5 раз. Очищенный эфир подкисляют 2%-ным раствором HCl (10 мл на 1 л эфира).

Ход работы. 5–10 г высушенного и измельченного растительного материала заливают 150 мл подкисленного и очищенного эфира и оставляют на 20 ч на холоде. Затем эфирный экстракт сливают и материал промывают два раза по 30 мин новыми порциями эфира по 50 мл при встряхивании. Экстракты объединяют. Растительный материал после извлечения свободных фенольных соединений подсушивают в токе холодного воздуха и проводят следующую экстракцию 70%-ным этанолом в течение 6 ч на аппарате для встряхивания жидкостей. Растворы этанола (по 50 мл) меняют четыре раза. Экстракты фильтруют и объединяют.

Экстракты очищают от пигментов и липидов. С этой целью к ним приливают 50 мл воды и упаривают под тягой до водного остатка. Для связывания фенолов приливают равный объем 1 н. водного раствора NaHCO_3 . Раствор переносят в делительную воронку и многократно промывают эфиром (в щелочной среде фенолы не переходят в эфир). Затем подкисляют экстракты соляной кислотой (рН 3,0) и свободные фенольные соединения экстрагируют четырьмя порциями подкисленного эфира по 50 мл.

В эфирный экстракт могут переходить флавоноидные агликоны, для их выделения проводят экстракцию петролейным эфиром. Очищенные экстракты выпаривают под вакуумом. Остат-

ки растворяют в 1 мл 96%-ного этанола или 70%-ного этанола (спиртовый экстракт).

Если ставится задача анализа агликонов фенольных соединений, то проводят гидролиз фенольных экстрактов. Упаренные остатки заливают раствором 2 н. HCl и кипятят 20 мин на водяной бане. Гидролизат охлаждают, подводят pH раствора к 3,0 и агликоны экстрагируют в делительной воронке подкисленным серным эфиром, как описано выше. Эфирные экстракты обезживают и упаривают досуха. Остатки растворяют в небольшом объеме этанола.

Экстракция по методу М. В. Разумовой (1979)

Основывается на извлечении фенольных соединений водным раствором этанола.

Оборудование и реактивы. Делительная воронка, роторный испаритель, аппарат Сокслета.

80%-ный водный этанол, диэтиловый эфир, петролейный эфир, уксусноэтиловый эфир, н-бутанол, 0,1 н. HCl.

Ход работы. Высушенный и измельченный растительный материал обезжиривают в аппарате Сокслета низкокипящей фракцией петролейного эфира. 5–10 г растительной ткани после обезжиривания заливают 80%-ным этанолом (15 мл спирта на 1 г материала) и настаивают в течение ночи при комнатной температуре. Затем жидкость сливают, и материал дважды экстрагируют новыми порциями спирта того же объема по 2 ч при встряхивании. Спиртовые экстракты объединяют и упаривают под вакуумом на роторном испарителе при 40°C. Водный остаток подкисляют 0,1 н. HCl (pH 5,0), переносят в делительную воронку и проводят фракционирование экстракта последовательной обработкой диэтиловым эфиром, этилацетатом, н-бутанолом. Каждым растворителем обрабатывают экстракт три раза при встряхивании. Соотношение водной и органической фазы — 1:1,5. Эфирную, этилацетатную и бутанольную фракции упаривают под вакуумом почти досуха. Остатки растворяют в 1–2 мл 96%-ного этанола и используют для хроматографического разделения.

4.6.2. Хроматографическое разделение фенольных соединений

Широкое распространение получил метод разделения фенольных соединений на бумаге. Во многих случаях он дает наи-

лучшие результаты. Используется также тонкослойная хроматография, преимущество которой — в скорости разделения. В качестве сорбентов применяют силикагель, полиамид, целлюлозу.

Хроматографическое разделение на бумаге проводят в высоких (60 см) камерах в восходящем и нисходящем токе растворителя, в темноте, при комнатной температуре. Могут использоваться бумаги: "Ленинградская" марки "С" и "М", Filtrak FN 1, 2, 3, 11, 12, Wattman 1, 2, 3 и 3 MM. Атмосфера в камере должна быть насыщена парами растворителей, поэтому за день до хроматографирования в камеру наливают 100 мл растворителя. Экстракты наносят пятнами на стартовую линию из расчета 0,05–0,2 г сухого вещества на пятно с помощью микропипеток и капилляров.

Для разделения фенольных соединений обычно используют кислые системы растворителей. В кислых растворах подается диссоциация фенольных оксигрупп, пятна получаются более четкими. В щелочных системах фенолы слабо подвижны, некоторые быстро окисляются. Хорошие результаты дает разделение в двух направлениях. Наиболее употребительными являются смеси *n*-бутанола, уксусной кислоты и воды в разных соотношениях (4:1:5, 40:12:28, 6:1:2). Иногда вместо *n*-бутанола используют изобутанол. Смесь *n*-бутанол—ледяная уксусная кислота—вода (4:1:5) двухфазна, используют верхний слой. Другие смеси однофазны. Разделение во втором направлении проводят в водных растворах уксусной кислоты концентрацией от 2 до 60%.

Для разделения антоцианов используют смеси *n*-бутанол—2 н. HCl (1:1) и муравьиная кислота—концентрированная HCl—вода (40:10:30).

Для анализа агликонов используют смеси Форестола: ледяная уксусная кислота—концентрированная HCl—вода (30:3:10), толуол—ледяная уксусная кислота—вода (4:1:5). Во второй смеси используют верхнюю фазу. В первой системе хорошо разделяются антоцианы, флавоноидные агликоны, фенолкарбоновые кислоты. Последние локализируются в верхней части хроматограммы и их затем хроматографируют во второй системе.

Различные системы растворителей для бумажной и тонкослойной хроматографии представлены в монографиях Дж. Харборна (1968), Л. К. Клышева и соавт. (1978).

4.6.3. Идентификация фенольных соединений

Предварительная идентификация фенольных соединений на хроматограмме заключается в выяснении их принадлежности к определенной группе. Измеряют R_f пятен, оценивают их цвет в видимом и ультрафиолетовом свете, изменение флюоресценции в УФ-свете после обработки специальными реактивами. В видимом свете наблюдаются желтые пятна флавонолов, халконов и аурионов, пятна антоцианов, остальные вещества бесцветны. В УФ-свете поглощают все фенольные соединения и проявляются в виде пятен различного цвета. Окраска может изменяться или усиливаться в парах аммиака (табл. 4.6).

Таблица 4.6. Флюоресценция фенольных соединений при хроматографировании на бумаге (по М. Н. Запрометову, 1974)

Группа соединений	Флюоресценция в УФ-свете	
	Без обработки	После обработки NH_3
Бензойные кислоты	Голубая или синяя (п-оксибензойная кислота не флюоресцирует)	Голубая или синяя
Коричные кислоты	Голубая (п-кумаровая кислота не флюоресцирует)	Глубая или синяя
Кумарины	Голубая или синефиолетовая	Часто гасится, иногда приобретает розовато-оранжевый цвет
Катехины	Простые катехины бесцветны, галлированные дают темные пятна с фиолетовым оттенком	В случае галлированных катехинов — быстро проходящая серо-голубая флюоресценция
Лейкоантоцианы	Нет	Нет
Дигидрохалконы	Слабая фиолетовая	Не меняется
Халконы	Желтая и коричневая	Красная
Флаваноны	Нет	Нет или слабая желтая
Антоцианы	Розовая и красная	Синеватая
Аурионы	Желтая и оранжевая	Оранжевая или коричневая
Флавоны	Тускло-коричневая	Ярко-желтая
Флавонолы	Желтая, желто-зеленая (3-гликозиды — коричневая)	Ярко-желтая, часто с зеленоватым оттенком
Изофлавоны	Слабая розовая или темная	Не меняется
Стильбены	Интенсивно-голубая	Усиливается

Для дальнейшей идентификации выполняют цветные реакции. Количественное определение отдельных фенольных соединений и некоторые качественные реакции проводят после хроматографического разделения. Пятна фенольных соединений вырезают и элюируют подходящим растворителем (этанолом, метанолом, водой, смесью воды и спирта).

4.6.3.1. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

1. Универсальной реакцией является взаимодействие фенольных соединений с солями железа. Три фенольных ядра взаимодействуют с одним атомом железа, образуется комплексное соединение. Готовят 1%-ный раствор FeCl_3 в метаноле (этаноле) или 0,2%-ный раствор железо-аммиачных квасцов. Зеленая окраска развивается в присутствии производных пирокатехина, синюю дают производные пирогаллола, коричневато-оливковую — флавонолы.

2. Смесь равных объемов 1%-ных водных растворов FeCl_3 и $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, приготовленная непосредственно перед использованием, дает с полифенолами ярко-синюю окраску. Для предотвращения окрашивания фона хроматограмму опрыскивают разбавленной соляной кислотой.

3. Фенольные соединения восстанавливают аммиачный раствор азотнокислого серебра. К 20 мл 5%-ного водного раствора AgNO_3 добавляют 10%-ный раствор NH_4OH до растворения осадка, раствор разбавляют водой до 100 мл. Фенольные соединения при опрыскивании дают коричневые пятна.

4. Фенолы взаимодействуют с диазотированными ароматическими аминами. Амины (п-нитроанилин, сульфаниловая кислота, бензидин, анилин) диазотируют нитритом в соляной кислоте. Равные объемы 5%-ного раствора NaNO_2 и 0,5%-ного раствора п-нитроанилина в 2 н. HCl смешивают с тремя объемами 20%-ного водного раствора ацетата натрия. Для обработки хроматограмм используют свежеприготовленный реактив. Развивается оранжево-красная окраска диазосоединений. Она устойчива и пригодна для количественного определения. Фенолы можно элюировать до и после обработки реагентом.

5. При реакции молибдата натрия или аммония с фенольными соединениями, содержащими орто ди- и триоксигруппы, появляется желтое окрашивание, максимум поглощения при 300–320 нм. Для опрыскивания используют 5%-ный водный раствор

Na_2MoO_4 или $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$.

6. Фенольные соединения с мета-расположенными оксигруппами, а также лейкоантоцианы и катехины дают при реакции с ванилином в сильнокислом растворе ярко-красное окрашивание. Готовят 1%-ный раствор ванилина в концентрированной соляной кислоте (удельный вес 1,19 г/см³). Этим реактивом опрыскивают хроматограммы.

7. При добавлении 1%-ного персульфата калия $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ в концентрированной серной кислоте к ацетоновому раствору исследуемого вещества катехины и лейкоантоцианы дают фиолетовую окраску, переходя в антоцианидины.

8. Хроматограмму опрыскивают 3%-ным раствором п-толуол-сульфокислоты в этаноле и нагревают 5–10 мин при 103°C. Окрашенные пятна дают катехины, лейкоантоцианы и флаванолы.

9. При опрыскивании хроматограмм 1–5%-ным раствором $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в метиловом или этиловом спирте выявляются желтые пятна флавонов, флавонолов, флаванонов и флаванололов. В УФ-свете флюоресценция изменяется, флавоны и флавонол-3-гликозиды меняют цвет от темно-бурого к желтому.

10. Проба Синода применяется для идентификации флавоноидов. Фенольные соединения восстанавливаются магнием в соляной кислоте. К этанольному элюату добавляют немного пылевидного порошка магния и по каплям приливают концентрированную соляную кислоту. Флавоны, флавонолы, флаваноны окрашиваются в красный и красно-оранжевый цвет.

11. Реактив Вильсона обнаруживает 5-оксифлавоны и 2-оксихалконы. Смешивают равные объемы насыщенного раствора борной кислоты в ацетоне и 10%-ного раствора лимонной кислоты в ацетоне. После опрыскивания хроматограмм появляются ярко-желтые пятна этих соединений.

12. Флавоноиды обнаруживают в реакции с уксуснокислым свинцом. Опрыскивание хроматограмм 1%-ным водным раствором нейтрального или основного уксуснокислого свинца приводит к появлению желтых и красных пятен флавонов, флавонолов, халконов и ауронов.

4.6.3.2. АНАЛИЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПО СПЕКТРАМ ПОГЛОЩЕНИЯ

Все фенольные соединения построены на основе ароматических колец и интенсивно поглощают в УФ-области спектра.

По положению максимумов поглощения можно предварительно оценить принадлежность вещества к определенной группе фенольных соединений. Заместители у бензольных ядер сдвигают максимум поглощения соединения, гидроксильные и карбоксильные группы — в длинноволновую область, метильные и гликозидные — в коротковолновую область (табл. 4.7).

Таблица 4.7. Максимумы поглощения фенольных соединений в УФ-свете

Группы соединений	Основные максимумы, нм	Дополнительные максимумы, нм
Простые фенолы	265-275	Нет
Коричные кислоты	230-240	— " —
	290-330	— " —
	220-230	260
Кумарины	310-350	300
	365-390	240-280
Халконы	390-430	240-270
Аурины	270-280	Нет
Катехины	270-280	— " —
Лейкоантоцианы	275-290	310-330
Флаваноны	475-560	275
Антоцианы	250-270	Нет
Флавоны	330-350	— " —
	255-265	310-330
Изофлавоны	350-390	Нет

По величине поглощения в УФ-свете можно определить количество фенольного соединения в элюате после хроматографирования. Калибровочные кривые строят по чистым образцам тех же соединений. При измерениях контролем служит элюат из чистого участка хроматограммы.

4.6.4. Количественное определение фенольных соединений

Возможно количественное определение как общего содержания фенолов в растительной ткани, так и содержания отдельных фенольных соединений после их разделения методами хроматографии. В случае хроматографии на бумаге пятно искомого соединения вырезают и элюируют полярным растворителем. Содержание вещества в элюате определяют колориметрическими методами, а также по поглощению в УФ-свете (см. выше).

4.6.4.1. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКТИВА ФОЛИНА-ДЕНИСА

Метод позволяет определять содержание фенолов в общем экстракте и индивидуальных фракциях.

Реактив Фолина-Дениса. Вольфрамат натрия $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 г) смешивают с фосфорномолибденовой кислотой (20 г), 85%-ной H_3PO_4 (50 мл) и дистиллированной водой (750 мл). Смесь кипятят в круглодонной колбе, соединенной с обратным холодильником, на песчаной бане 2 ч, фильтруют и разбавляют водой до 1 л.

Ход работы. Аликвотную часть анализируемого раствора, содержащую не более 0,5 мл метанола или этанола, переносят в мерную пробирку на 10 мл. Добавляют дистиллированную воду до 7 мл, перемешивают и вносят 0,5 мл реактива Фолина-Дениса. Содержимое пробирки перемешивают и точно через 3 мин добавляют 1 мл насыщенного раствора Na_2CO_3 . Объем смеси доводят водой до 10 мл, перемешивают. Через час измеряют оптическую плотность при 725–730 нм. В случае появления осадка или мути раствор перед колориметрированием фильтруют или центрифугируют.

Для построения калибровочной кривой используют чистый реактив галловой кислоты. При анализе суммарных экстрактов следует учитывать, что с реактивом Фолина-Дениса взаимодействуют ароматические аминокислоты и некоторые другие вещества.

4.6.4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛЕЙКОАНТОЦИАНОВ И КАТЕХИНОВ

Непродолжительное нагревание спиртовых или водно-спиртовых растворов лейкоантоцианов с соляной кислотой приводит к их превращению в окрашенные антоцианы. Соли железа способствуют более полному протеканию реакции.

Реактивы. Раствор 1: смешивают 2 объема концентрированной соляной кислоты и 3 объема н-бутанола. Раствор 2: 77 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл раствора 1. Смешивают 80 мл раствора 1 и 20 мл раствора 2.

Ход работы. К 0,5 мл экстракта приливают 5 мл полученного реактива. Пробирку закрывают пробкой со шлифом и нагревают на кипящей водяной бане 15 мин. После охлаждения измеряют оптическую плотность при 525–550 нм. В качестве

стандарта используют раствор очищенного антоциана, характерного для исследуемого объекта.

Цветная реакция катехинов и лейкоантоцианов с ванилином (см. 4.6.3.1) используется для их количественного определения.

Реактивы. 1%-ный раствор ванилина в HCl (плотность 1,19 г/см³); раствор катехина (0,5 мг/мл) в 80%-ном этаноле, встряхивают 20 мин.

Ход работы. К 1 мл экстракта, спиртового или водного, добавляют 5 мл раствора ванилина в соляной кислоте и перемешивают. Через 20 мин определяют оптическую плотность раствора с помощью ФЭК'а при зеленом светофильтре или спектрофотометра при 500 - 520 нм. В качестве стандарта используют раствор катехина.

Метод пригоден для количественного определения гидролизуемых дубильных веществ катехинового ряда.

4.6.5. Количественное определение дубильных веществ

Дубильные вещества, или таннины образуют с белком кожи коллагеном прочные поперечно-связанные структуры, делающие кожу водонепроницаемой и не подверженной гниению. Дубильные вещества делят на гидролизуемые и конденсированные. Гидролизуемые таннины содержат гликозидные и сложноэфирные связи. Бензольные ядра у них соединены через атомы кислорода. Известны таннины галловой и гексагидроксидифеновой (элаговой) кислот, у которых к одной молекуле глюкозы или другого сахара присоединены пять и более остатков соответствующей фенолокислоты. Конденсированные дубильные вещества при нагревании уплотняются с образованием высокополимерных флобафенов. Конденсированные дубильные вещества являются полимерами катехинов и лейкоантоцианов, бензольные ядра которых связаны через углеродные атомы.

Дубильные вещества имеются в клеточном соке различных органов и тканей растений. Высокое содержание этих соединений обнаружено в коре деревьев, листовых галлах, в корнях растений.

Таннины — аморфные вещества серого или желтого цвета, растворимые в воде, ацетоне и спирте, на воздухе окисляются в темно-коричневые продукты. Таннины образуют осадки с кожным (гольевым) порошком, желатиной, полиамидами, алка-

лоидами, тяжелыми металлами. Свойство образовывать осадки используют для качественного и количественного анализа дубильных веществ. Многие химические реакции таннинов, ведущие к окислению реагентов, образованию цветных продуктов, в основном совпадают с аналогичными реакциями мономерных фенолов. Существует множество методов количественного определения дубильных веществ.

4.6.5.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ОСАЖДЕНИЕМ ЖЕЛАТИНОЙ

Классический метод осаждения таннинов кожным порошком не всегда дает точные результаты, так как наряду с таннинами осаждается часть недубильных веществ — фенолокислот, органических кислот и др. Желатина, примененная в методе П. А. Якима и Г. В. Куршаковой (1961), более избирательно связывает таннины. Однако если содержание галловой кислоты в экстракте превышает 12%, происходит ее частичное связывание с желатиной.

Принцип метода. Дубильные вещества экстрагируют дистиллированной водой, холодной, затем горячей, и титруют раствором желатины известной концентрации.

Реактивы. 0,4%-ный раствор таннина: 1 г чистого фармацевтического таннина растворяют в теплой дистиллированной воде, раствор охлаждают и доводят его объем до 250 мл.

0,5%-ный раствор желатины: 2,5 г измельченной пищевой желатины заливают 50 мл холодной дистиллированной воды на 30 мин для набухания; воду сливают, желатину растворяют в нагретой до 45°C воде; раствор переносят в колбу на 500 мл, туда же вносят 50 г NaCl, раствор охлаждают, доводят его объем до метки, взбалтывают, фильтруют через складчатый фильтр. Раствор хранят в холодильнике 5–7 дней. Перед употреблением раствор нагревают до 40°C на водяной бане и охлаждают.

Ход работы. 2 г измельченного сухого материала (кора дерева) заливают на ночь 40 мл дистиллированной воды. Настой фильтруют через два слоя марли в мерную колбу на 250 мл. Материал заливают 30 мл воды, нагретой до 50°C и ставят на водяную баню на 20 мин, поддерживая ту же температуру. Жидкость сливают в колбу. Материал заливают водой, нагретой до 70°C, и настаивают 20 мин при этой температуре на водяной бане. Процедуру проводят дважды. Затем материал заливают кипящей водой и кипятят на водяной бане. Операцию выпол-

няют несколько раз, до полного извлечения таннинов. Полноту извлечения проверяют, добавляя к пробе 2 капли желатины. Если дубильных веществ нет, муть не появляется.

Устанавливают титр желатины по таннину. В пять пробирок наливают по 5 мл 0,4%-ного раствора таннина и прибавляют в них 1, 2, 3, 4, 5 мл раствора желатины. Пробирки закрывают пробками и встряхивают 3 мин. Осадки желатин-таннатов отфильтровывают в чистые пробирки через бумажные фильтры. Фильтраты просматривают в проходящем свете. В прозрачных растворах есть таннин, в мутных — избыток желатины. В прозрачные растворы добавляют по 2 капли желатины и снова смотрят в проходящем свете. Отмечают фильтрат, который от добавления желатины не помутнел, соответственно в нем нет таннинов. Если это фильтрат из пятой пробирки, то полное осаждение таннинов было достигнуто между четвертым и пятым растворами. Берут еще четыре пробирки и в них проводят более дробный анализ. К 5 мл раствора таннина приливают 4,2, 4,4, 4,6 и 4,8 мл раствора желатины, перемешивают, фильтруют, добавляют 2 капли желатины и оценивают прозрачность растворов. Находят границу прозрачности, например, растворы с 4,4 и 4,6 мл желатины. В чистую пробирку с 5 мл таннина добавляют 4,5 мл желатины, перемешивают, фильтруют, добавляют 2 капли желатины. Если раствор остался прозрачным, то 4,5 мл — объем раствора желатины, необходимый для связывания 5 мл раствора таннина. Если наблюдается слабая опалесценция, то искомый объем — 4,6 мл.

Титр раствора желатины выражают в граммах таннина. Определяют сухой остаток 5 мл раствора таннина, например 0,019 г. Стандартным методом (с кожным порошком) определяют содержание таннина в препарате — 95%. Следовательно в 5 мл раствора — 0,0181 г таннина. Титр раствора желатины равен: $0,0181 : 4,6 = 0,00398$ (г).

Далее анализируют опытный материал. Ход анализа соответствует описанному выше. Устанавливают с точностью до 0,1 мл объем раствора желатины, необходимый для осаждения дубильных веществ из 5 мл раствора. Полученную величину умножают на значение титра и рассчитывают содержание таннинов в процентах на сухой вес.

Если растительный материал беден дубильными веществами, то добавляемые объемы раствора желатины уменьшают до долей миллилитра.

4.6.5.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ПО КОЛИЧЕСТВУ БЕЛКА В ТАННИН-БЕЛКОВОМ КОМПЛЕКСЕ

Таннины образуют комплексы с белками различного происхождения, они способны осаждать бычий сывороточный альбумин (БСА). По количеству осажденного белка можно оценить содержание дубильных веществ в исследуемом материале. Один из современных подходов состоит в анализе количества аминокислот нингидриновым методом после щелочного гидролиза таннин-белкового комплекса. Метод Х. П. С. Маккара и сотр. (1987) позволяет определить малые количества дубильных веществ. Присутствие других фенольных соединений не мешает определению таннинов по этому методу.

Принцип метода. Дубильные вещества извлекают водным раствором этанола. Определяют их содержание на основании измерения количества белка в таннин-белковом комплексе с нингидриновым реактивом после щелочного гидролиза.

Оборудование и реактивы. Термостат, водяная баня, центрифуга на 5000 g.

Водный раствор БСА (4 мг/мл); раствор БСА (1 мг/мл) в буфере: 0,2 М ацетатный буфер (pH 5,0), содержащий 0,17 М NaCl; 13,5 н. раствор NaOH; ледяная уксусная кислота; нингидриновый реактив; раствор таннина или танниновой кислоты (2 мг/мл) в 50%-ном водном этаноле или метаноле.

Ход работы. Для построения калибровочной кривой определения БСА с нингидриновым реактивом проводят щелочной гидролиз белка. В пробирки вносят 0,2–2 мг БСА в 50–500 мкл водного раствора. Растворы высушивают в термостате при 100°C. К высушенному белку добавляют 0,6 мл 13,5 н. раствора NaOH и помещают в термостат с температурой 120°C на 20 мин. Гидролиз можно проводить в автоклаве под давлением 1,054 кг/см² 20 мин при 121°C. Пробирки охлаждают и добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты по каплям для нейтрализации щелочи. Отбирают по 0,1 мл каждого образца и смешивают с 1 мл нингидринового реактива. Пробирки, закрытые стеклянными шариками, помещают на 20 мин в кипящую водную баню. После охлаждения добавляют 5 мл воды, перемешивают и измеряют поглощение при 570 нм.

Далее определяют зависимость между количествами белка и таннина в таннин-белковом комплексе, осаждаемом из рас-

творов известной концентрации. В центрифужных стеклянных пробирках смешивают 2 мл раствора БСА (1 мг/л) в ацетатном буфере и 0,2–1,2 мг (0,1–0,6 мл) таннина в 50%-ном этаноле. Общий объем смеси доводят буфером до 3 мл. Содержимое пробирок осторожно перемешивают и оставляют на 15 мин при комнатной температуре. Затем центрифугируют при 5000 *g* 20 мин. Супернатант отбрасывают, осадок дважды промывают ацетатным буфером с NaCl и центрифугируют. К осадку таннин-белкового комплекса добавляют 0,6 мл 13,5 н. NaOH и проводят гидролиз, как описано выше. Строят график зависимости между содержанием белка и таннина в комплексе. По оси абсцисс откладывают количество таннина, миллиграммы, по оси ординат – количество БСА, миллиграммы.

Для получения грубого экстракта дубильных веществ 50–100 мг измельченного сухого растительного материала (например, листьев дуба) обезжиривают с помощью 5 мл диэтилового эфира в течение 15 мин. Эфирный экстракт отбрасывают. Таннины извлекают из остатка 5 мл метилового или этилового спирта в течение 15 мин. Осадок отделяют центрифугированием при 1–2 тыс. *g*. Процедуру проводят два раза. Объединенные спиртовые экстракты упаривают под вакуумом и остаток растворяют в 1 мл 50%-ного этанола. К 0,2–0,5 мл экстракта добавляют 2 мл раствора БСА в ацетатном буфере и проводят анализ, как описано выше, для раствора таннина.

4.6.6. Определение лигнина

Лигнин – трехмерный полимер фенольной природы с молекулярной массой около 10 тыс. Исходными фенольными соединениями для биосинтеза лигнина служат п-оксикоричный, канифериловый и синаповый спирты. Лигнин, представляющий собой аморфное вещество, содержится в одревесневших растительных тканях, где занимает пространство между целлюлозными фибриллами. Содержание лигнина в древесине хвойных деревьев (26–30%) выше, чем у лиственных пород (20–22%). У всех остальных растений содержание лигнина более низкое. Лигнина нет в мягких и очень сочных травах, клубнях картофеля, во мхах и хвощах.

Лигнин термопластичен, очень мало растворим в воде и органических растворителях (5–10%), устойчив к действию кислот, почти не растворяется в крепкой серной кислоте. После обработки древесины 75%-ной серной кислотой лигнин остается в

виде черно-коричневого осадка, тогда как все остальные компоненты сжигаются. Лигнин может быть переведен в растворимое состояние обработкой растительного материала сернистой кислотой, бисульфитом натрия, горячей щелочью. Эти свойства используются для отделения лигнина от других веществ и его количественного определения.

Принцип метода. Лигнин отделяют от сопутствующих веществ последовательной обработкой растительной ткани 1%-ной уксусной кислотой (для удаления сахаров, органических кислот и других водорастворимых веществ), ацетоном или смесью этанола и эфира (для удаления липидов, хлорофилла и других веществ, растворимых в органических растворителях) и 72%-ной серной кислотой (для удаления целлюлозы и гемицеллюлоз). Лигнин полностью окисляется бихроматом калия в присутствии серной кислоты. Избыток бихромата определяют титрованием солью Мора или иодометрическим способом.

Оборудование и реактивы. Настольная центрифуга со стеклянными пробирками, электрическая плитка, ареометр.

1%-ная уксусная кислота; 72%-ная серная кислота (смешивают 700 мл воды и 170 мл концентрированной H_2SO_4 , охлаждают, измеряют ареометром плотность и подводят ее к значению $1,63 \text{ г/см}^3$); бихроматный реактив (25 г $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ растворяют в 250 мл дистиллированной воды и приливают 800 мл концентрированной H_2SO_4 с плотностью $1,81 \text{ г/см}^3$, хранят в темноте); 0,1 н. раствор соли Мора (40 г соли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 400 мл дистиллированной воды, добавляют 20 мл концентрированной H_2SO_4 и доливают воды до 1 л, перемешивают, хранят неделю; нормальность проверяют по 0,1 н. раствору бихромата калия: к 25 мл 0,1 н. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ добавляют 5 мл концентрированной H_2SO_4 , 3–5 капель фенолантраниловой кислоты и титруют раствором соли Мора до зеленой окраски); 0,2%-ная фенолантраниловая кислота (0,1 г $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{NH} - \text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$ растирают в ступке с 5 мл 0,1 н. NaOH , доводят водой до 50 мл и хранят в темной склянке), 10%-ный раствор BaCl_2 .

Ход работы. Навески ткани (0,05–0,1 г измельченных сухих листьев, стеблей, соломы) помещают в центрифужные пробирки и заливают 10 мл 1%-ной уксусной кислоты. Если используют свежую растительную ткань, то 0,2–0,5 г материала растирают в ступке с 5 мл 1%-ной уксусной кислоты и переносят в пробирку, смывая остаток небольшими порциями кислоты. Содержимое пробирок помещивают 5 мин и центрифугируют 5 мин при

1000 г. Осадки промывают 5 мл 1%-ной уксусной кислоты, переосаждают. Затем осадки промывают три раза ацетоном или смесью этанола с диэтиловым эфиром (1:1) порциями по 4 мл, настаивая 3 мин при помешивании, и центрифугируют. Осадок распределяют по стенкам пробирки, чтобы избежать выбрасывания, пробирки помещают в горячую водяную баню на 5–10 мин до полного высыхания осадков.

Далее в пробирки приливают по 3 мл 72%-ной серной кислоты, осадки размешивают стеклянной палочкой и оставляют на ночь при комнатной температуре. Затем в пробирки наливают по 10 мл дистиллированной воды и помещают их в кипящую водяную баню на 5 мин. После охлаждения проб в них добавляют 5 мл воды и 0,5 мл 10%-ного раствора BaCl_2 . Выпадает осадок BaSO_4 , который увлекает лигнин и облегчает центрифугирование и удаление надосадочной жидкости. Пробы центрифугируют, надосадочную жидкость сливают по стеклянной палочке. Осадки промывают двумя порциями воды по 10 мл, тщательно перемешивая.

К осадку лигнина добавляют 10 мл 0,5 н. раствора бихромата калия в серной кислоте и помещают пробирки в кипящую водяную баню на 15 мин, периодически помешивая. Пробирки охлаждают и переносят их содержимое в колбы для титрования, смывая осадок 15–20 мл воды. Добавляют по 4–5 капель фенолантраниловой кислоты и избыток бихромата титруют 0,1 н. раствором соли Мора до перехода окраски содержимого колб от вишнево-фиолетовой в зеленую. В контрольной пробе вместо опытного раствора используют дистиллированную воду.

Содержание лигнина в процентах на сухой вес вычисляют по формуле:

$$X = \frac{4,33 \cdot N \cdot (a - b)}{H} \cdot 100,$$

где a , b — объемы раствора соли Мора, затраченные на титрование бихромата в контрольной и опытной пробе соответственно (мл), N — нормальность титрованного раствора соли Мора, H — навеска исследуемого материала (мг), 4,33 — грамм-эквивалент лигнина, установленный при определении расхода бихромата калия на окисление препарата лигнина из стеблей льна.

Литература

Арасимович В. В., Балтага С. В., Пономарева Н. П. Методы анализа пектиновых веществ, гемицеллюлоз и пектолитических ферментов в плодах. Кишинев, 1970. 84 с.

Голяновская С. А., Баврина Т. В. и др. Сравнение методов количественного определения нуклеиновых кислот в тканях и органах высших растений// Физиология растений. 1974. Т. 21, №2. С. 427–436.

Ермаков А. И. Определение органических кислот// Методы биохимического исследования растений/Под ред. А.И.Ермакова. Л., 1987. С. 173–188.

Запроматов М. Н. Основы биохимии фенольных соединений. М., 1974. 214 с.

Кейтс М. Техника липидологии. М., 1975. 322 с.

Конарев В. Г., Тютюев С. Л. Методы биохимии и цитохимии нуклеиновых кислот растений. Л., 1970. 204 с.

Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)/Под ред. М.И.Прохоровой. Л., 1982. 272 с.

Никулина Г. Н. Методы определения нуклеотидов в растениях. Л., 1980. 87 с.

Разумова М. В. Методические рекомендации для определения веществ фенольной природы// Методы определения фитогормонов и фенолов в семенах/Под ред. М.Г.Николаевой. Л., 1979. С. 61–71.

Синютина Н. Ф., Толстикова Г. В., Швец В.И. Выделение и фракционирование липидов колеоптилей кукурузы// Физиология растений. 1978. Т. 25, №3. С. 610–614.

Скоупс Р. Методы очистки белков. М., 1985. 358 с.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding//Anal. Biochem. 1976. Vol. 72, №1/2. P. 248–254.

Davis B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins// Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964. Vol. 121. P. 404–427.

Itzhaki R. F., Gill D. M. A microbiuret method for estimating proteins // Anal. Biochem. 1964. Vol. 9, №4. P. 401–410.

Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T 4//Nature. 1970. Vol. 227, №5259. P. 680–685.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent//J.Biol. Chem. 1951. Vol. 193, №1. P. 265–275.

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>Глава 1. Техника лабораторных работ</i>	
1.1. Требования к помещению лаборатории	3
1.2. Основное лабораторное оборудование	—
1.3. Техника безопасности при работе в лаборатории	4
1.4. Химические реактивы и препараты	7
1.5. Химическая посуда и другие принадлежности	8
1.5.1. Посуда общего назначения	—
1.5.2. Посуда специального назначения	11
1.5.3. Мерная посуда и дозаторы	12
1.6. Мытье и сушка химической посуды	16
1.6.1. Мытье посуды	—
1.6.2. Сушка посуды	18
1.7. Приготовление дистиллированной воды	19
1.8. Приготовление растворов	20
1.8.1. Способы выражения концентраций рабочих (титрованных) растворов	—
1.8.2. Расчеты концентраций при смешивании и разбавлении растворов	22
1.8.3. Приготовление титрованных растворов кислот	23
1.8.4. Приготовление 0,1 н. раствора едкого натра	24
1.9. Экстракция, кристаллизация, выпаривание, высушивание	25
1.10. Фильтрование	27
1.11. Охлаждающие смеси	29
1.12. Весы и взвешивание	—
Литература	31
<i>Глава 2. Методы разделения веществ</i>	
2.1. Диализ и молекулярная фильтрация	32
2.2. Центрифугирование	33
2.2.1. Препаративное центрифугирование	34
2.2.2. Аналитическое центрифугирование	35
2.3. Хроматография	—
2.3.1. Адсорбционная хроматография	36
2.3.1.1. Жидкостная адсорбционная хроматография	—
2.3.1.2. Ионообменная хроматография	37
2.3.1.3. Тонкослойная хроматография	38
2.3.1.4. Аффинная хроматография	40
2.3.1.5. Газовая адсорбционная хроматография	42
2.3.2. Распределительная хроматография	43
2.3.2.1. Газожидкостная хроматография	44
2.3.2.2. Гель-проникающая хроматография	45

2.3.2.3. Хроматография на бумаге	46
2.4. Электрофорез	47
2.4.1. Зональный электрофорез	48
2.4.2. Изоэлектрофокусировка	50
2.4.3. Иммуноэлектрофорез	—
Литература	51
Глава 3. Аналитические методы и аппаратура	
3.1. Объемный анализ	52
3.1.1. Метод нейтрализации	53
3.1.2. Оксидиметрия	55
3.1.2.1. Бихроматометрия	—
3.1.2.2. Перманганатометрия	56
3.1.3. Манометрия	57
3.2. Основы весового анализа	59
3.3. Физико-химические методы анализа	61
3.3.1. Электрохимические методы	—
3.3.1.1. Потенциометрия	62
3.3.1.2. Кондуктометрия	64
3.3.1.3. Полярография	66
3.3.2. Спектральные методы исследования	72
3.3.2.1. Адсорбционная спектроскопия	73
3.3.2.2. Инфракрасная спектроскопия	75
3.3.2.3. Колориметрия	76
3.3.2.4. Спектрофлуориметрия	79
3.3.2.5. Пламенная спектрофотометрия	81
3.3.2.6. Рефрактометрия	84
3.3.2.7. Поляриметрия	87
3.3.3. Масс-спектрометрия	89
3.3.4. Радиометрические методы	91
3.3.4.1. Суммарная радиоактивность препарата	92
3.3.4.2. Измерение радиоактивности жидкостными сцинтилляционными счетчиками	94
3.3.4.3. Метод изотопного разбавления	95
3.3.4.4. Радиоактивационный анализ	96
Литература	97
Глава 4. Биохимические методы	
4.1. Белки	98
4.1.1. Экстракция белков из тканей растений	99
4.1.1.1. Получение грубого ферментативного экстракта	100
4.1.1.2. Выделение суммарного количества белков	101
4.1.2. Количественное определение белков	—
4.1.2.1. Определение содержания белков по поглощению ультрафиолета	—
4.1.2.2. Метод Кьельдаля	103
4.1.2.3. Биуретовый и микробиуретовый методы	105
4.1.2.4. Определение количества белка с реактивом Фолина (метод Лоури)	107
4.1.2.5. Определение количества белка по сорбции красителя (метод Бредфорда)	109

4.1.3. Электрофорез белков.....	110
4.1.3.1. Нативный щелочной электрофорез.....	—
4.1.3.2. Электрофорез белков с ДДС по Лэммли.....	112
4.1.3.3. Двумерный электрофорез.....	114
4.1.4. Ионнообменная хроматография белков.....	—
4.1.5. Анализ свободных и входящих в белки аминокислот. Выделение и фракционирование аминокислот распре- делительной хроматографией на бумаге.....	116
4.2. Нуклеиновые кислоты.....	118
4.2.1. Извлечение нуклеиновых кислот из тканей растений ..	119
4.2.1.1. Модификация определения нуклеиновых кислот по Шмидту-Таннгаузеру.....	120
4.2.1.2. Выделение нуклеиновых кислот методом феноль- ной депротеинизации.....	121
4.2.2. Количественное определение нуклеиновых кислот.....	122
4.2.2.1. Определение содержания нуклеиновых кислот по поглощению ультрафиолета.....	123
4.2.2.2. Определение количества нуклеиновых кислот по содержанию фосфора.....	124
4.2.2.3. Определение содержания ДНК с помощью дифе- ниламина.....	126
4.2.2.4. Определение количества РНК по реакции с ор- цином.....	128
4.2.3. Электрофорез нуклеиновых кислот.....	129
4.2.4. Хроматография нуклеиновых кислот.....	131
4.2.5. Анализ нуклеотидов.....	133
4.3. Углеводы.....	135
4.3.1. Экстракция из растений фракций углеводов.....	136
4.3.2. Количественное определение углеводов.....	140
4.3.2.1. Определение содержания гексоз по реакции с ан- троном.....	—
4.3.2.2. Определение количества пентоз по реакции с ор- цином.....	142
4.3.2.3. Определение количества гексуроновых кислот по реакции с карбазолом.....	—
4.3.3. Хроматография сахаров. Разделение сахаров распре- делительной хроматографией на бумаге.....	143
4.4. Органические кислоты.....	144
4.4.1. Экстракция кислот из растительного материала и опре- деление содержания органических и минеральных, сво- бодных и связанных кислот.....	145
4.4.1.1. Выделение органических кислот.....	—
4.4.1.2. Определение содержания различных фракций ки- слот.....	146
4.4.2. Разделение органических кислот методами хроматогра- фии на бумаге и в тонком слое.....	150
4.4.2.1. Разделение и количественное определение ди- и трикарбоновых кислот с помощью хроматогра- фии на бумаге.....	—

4.4.2.2. Разделение органических кислот в тонком слое	153
4.4.3. Количественное определение некоторых кислот хроматографическими методами	154
4.4.3.1. Шавелевая кислота	—
4.4.3.2. Лимонная кислота	156
4.4.3.3. Аскорбиновая кислота	159
4.5. Липиды	161
4.5.1. Выделение липидов	162
4.5.1.1. Экстракция липидов из тканей растений	163
4.5.1.2. Экстракция липидов из субклеточных элементов	164
4.5.2. Некоторые методы анализа общих липидов	—
4.5.2.1. Определение иодного числа	165
4.5.2.2. Определение кислотного числа, числа омыления и эфирного числа	166
4.5.3. Разделение липидов методом тонкослойной хроматографии	168
4.5.4. Количественное определение липидов, разделенных методом тонкослойной хроматографии	173
4.5.4.1. Нейтральные липиды	—
4.5.4.2. Фосфолипиды	174
4.5.4.3. Гликолипиды	175
4.6. Фенольные соединения	—
4.6.1. Экстракция фенольных соединений	177
4.6.2. Хроматографическое разделение фенольных соединений	180
4.6.3. Идентификация фенольных соединений	182
4.6.3.1. Качественные реакции для идентификации фенольных соединений	183
4.6.3.2. Анализ фенольных соединений по спектрам поглощения	184
4.6.4. Количественное определение фенольных соединений	185
4.6.4.1. Колориметрический метод с использованием реактива Фолина-Дениса	186
4.6.4.2. Определение содержания лейкоантоцианов и катехинов	—
4.6.5. Количественное определение дубильных веществ	187
4.6.5.1. Определение дубильных веществ осаждением желатиной	188
4.6.5.2. Определение дубильных веществ по количеству белка в танин-белковом комплексе	190
4.6.6. Определение лигнина	191
Литература	194

Учебное издание

**Практикум
по биохимии растений.**

Под редакцией Полевого Всеволода Владимировича,
Шипарева Сергея Михайловича

Учебное пособие

Редактор *Е. В. Васильева*
Художественный редактор *Е. И. Егорова*
Технический редактор *А. В. Борцова*

ИБ № 4149

Издание подготовлено в \LaTeX

Лицензия ЛР № 040050 от 05.08.91 г.

Подписано в печать 26.02.96. Формат 60х84 1/16. Бумага офсетная.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 11,62. Усл. кр.-отт. 11,75. Уч.-изд. л. 11,47.
Тираж 420 экз. Заказ 48.

Издательство СПбГУ. 199034, С.-Петербург, Университетская наб., 7/9.

Участок оперативной полиграфии типографии Издательства СПбГУ.
199061, С.-Петербург, Средний пр., 41.

